

Antikolinerg aktivitet i utvalgte naturpreparater og næringsmidler



Berit Lynum

Masteroppgave i farmasi

Avdeling for farmasøytisk biovitenskap og Avdeling for farmasøytisk kjemi

Farmasøytisk Institutt

Det Matematisk- Naturvitenskapelige fakultet

UNIVERSITETET I OSLO

Mai 2010

Masteroppgave i farmasi

Antikolinerg aktivitet i utvalgte naturpreparater og næringsmidler

Av:

Berit Lynum

Utført ved:

Avdeling for farmasøytisk biovitenskap og

Avdeling for farmasøytisk kjemi

Farmasøytisk Institutt

Det Matematisk- Naturvitenskapelige Fakultet

Universitetet i Oslo

Veiledere:

Professor Espen Molden

Førsteamanuensis Hilde Barsett

Mai 2010

Forord

Denne masteroppgaven ble utført ved Avdeling for farmasøytisk biovitenskap og Avdeling for farmasøytisk kjemi, Farmasøytisk Institutt, Universitetet i Oslo, under veiledning av professor Espen Molden og førsteamanuensis Hilde Barsett.

Først vil jeg takke mine to veiledere, Espen Molden og Hilde Barsett, for en enestående veiledning og oppfølging gjennom hele masteroppgaven. Dere har vært til uvurderlig hjelp både med det faglige og det praktiske, og gjort dette til interessant og lærerikt år. Jeg har satt veldig stor pris på den raske tilbakemeldingen på alt arbeidet underveis og i selve skriveprosessen.

Takk til alle på Avdeling for farmasøytisk kjemi og på Avdeling for farmasøytisk biovitenskap som har vært tilgjengelige for spørsmål, kommet med råd og vært behjelpelige med praktiske problemer. En spesiell takk til Stine M. Jakobsen for flott hjelp til å komme i gang på laben og for tips og råd til gjennomføringen av selve oppgaven.

I tillegg vil jeg takke Maria for en fin oppstart med oppgaven, og alle andre medstudenter for å ha bidratt til at dette har vært et hyggelig år.

Jeg vil takke familie og venner for alle oppmuntrende ord og støtte underveis, og sist, men ikke minst vil jeg takke Eirik for at du er helt fantastisk snill og tålmodig.

Oslo, 14.05.2010

Berit Lynum

Innhold

FORORD	5
INNHold	7
FORKORTELSER	10
SAMMENDRAG	13
1. INNLEDNING	15
1.1 KOLINERG AKTIVITET	15
1.1.1 Acetylkin	15
1.1.2 Muskarinerge reseptorer.....	16
1.2 ANTIKOLINERG AKTIVITET, AA, AV LEGEMIDLER	18
1.3 NATURLEGEMIDLER, NATURMIDLER, KOSTTILSKUDD OG NÆRINGSMIDLER	19
1.3.1 Bær med høyt innhold av antioksidanter.....	20
1.3.2 Kosttilskudd, styrkende for immunforsvaret.....	22
1.3.3 Beroligende / søvnfremmende preparater.....	23
1.3.4 Prostataproblemer	24
1.3.5 Næringsmidler.....	25
2. HENSIKTEN MED OPPGAVEN.....	27
3. METODER OG MATERIALER.....	28
3.1 GENERELLE METODER.....	28
3.1.1 Vannkvalitet	28
3.1.2 Innveiging av stoff.....	28
3.1.3 Blanding av små volum.....	29
3.1.4 Frysetørking.....	29

3.1.5	<i>Filtrering</i>	30
3.1.6	<i>Ekstraksjon med Soxhlet</i>	31
3.1.7	<i>Sentrifugering</i>	32
3.1.8	<i>Inndamping på rotavapor</i>	33
3.2	TILBEREDING AV PREPARATER TIL MÅLING AV ANTIKOLINERG AKTIVITET, AA.....	34
3.2.1	<i>Tilbereding av bærmateriale</i>	34
3.2.2	<i>Tilbereding av kosttilskudd</i>	35
3.2.3	<i>Tilbereding av bitterlupinbønner for ekstrahering</i>	36
3.2.4	<i>Tilbereding av bitterlupinbønner</i>	37
3.2.5	<i>Ekstraksjon med diklormetan</i>	38
3.2.6	<i>Ekstraksjon med 96 % Etanol</i>	40
3.2.7	<i>Ekstraksjon med 50 % etanol</i>	41
3.3	MÅLEMETODE FOR ANTIKOLINERG AKTIVITET, AA	42
3.3.1	<i>Utstyr</i>	42
3.3.2	<i>Metode for måling av AA</i>	43
3.3.3	<i>Databehandling</i>	46
3.3.4	<i>Standardkurve med atropin</i>	47
3.3.5	<i>Fosfatbuffer</i>	50
3.3.6	<i>[³H]-QNB- løsning</i>	51
3.3.7	<i>Muskarinergt reseptorpreparat</i>	52
3.3.8	<i>Fosfatbuffer med BSA</i>	53
3.3.9	<i>Preparater til analyse</i>	54

3.3.10	<i>Kontrollprøver</i>	57
4.	RESULTAT	58
4.1	Ekstraksjon av materiale til måling av antikolinerg aktivitet, AA	58
4.2	Måling av antikolinerg aktivitet, AA, i utvalgte preparater	61
4.2.1	<i>Standardkurve og validering</i>	61
4.2.2	<i>Kontrollprøver og presentasjon av resultater</i>	62
4.2.3	<i>VitaePro®</i>	62
4.2.4	<i>Lutein, zeaxanthin og astaxanthin</i>	64
4.2.5	<i>Søtlupin og bitterlupinbønner</i>	66
4.2.6	<i>Prikkperikum, legevendelrot og dvergpalm</i>	68
4.2.7	<i>Bær med antioksidierende egenskaper</i>	71
5.	DISKUSJON	76
6.	KONKLUSJON	88
7.	VEIEN VIDERE	90
	KILDELISTE	91
	VEDLEGG I	96

Forkortelser

7-TMD	Syv transmembrane domener
50 % E	Etanol 50 %
96 % E	Etanol 96 %
AA	Antikolinerg aktivitet
ABTS*	2,2-azinobis-3-ethyl-benzothiazoline radikal
ACh	Acetylkolin
ARO	Svartsurbær
ASTA	Astaxanthin
BHB	Blod-hjerne-barrieren
BLÅ	Blåbær
BPH	Benign prostata hyperplasi
BSA	Bovint Serum Albumin
Bq	Bequerel
Ca ²⁺	Kalsium
CCPM	Correlated counts per minute (telletall)
CH ₂ Cl ₂	Diklormetan
Ci	Curie
CNS	Sentralnervesystemet

DMSO	Dimetylsulfoksid
DPPH*	1,1-Diphenyl-2-Picrylhydrazyl radikal
DVERG	Dvergpalme
FI	Farmasøytisk Institutt
G ₀ , G _i , G _q	G-proteiner med inhiberende eller aktiverende aktivitet
GTP	Guanintrifosfat
[³ H]-QNB	Tritiert quinuclidinyl benzilate
IC ₅₀	Konsentrasjon som gir 50 % hemming av radioligand
J.URT	Prikkperikum
H ₂ O	Renset vann
LB	Bitterlupinbønner
LDL	Low density lipoproteiner
LUT	Lutein
LUP	Søtlupin
mAChR	Muskarinerge acetylkolinreseptorer
MeOH	Metanol
M _w	Molekylvekt
NaOH	Natriumhydroksid
Na ₂ H ₂ PO ₄ * 2H ₂ O	Natriumdihydrogenfosfat
NO*	Nitrogenmonoksidradikal

Forkortelser

OH*	Hydrogenmonoksidradikal
ppm	Parts per million
R ²	Kvadrert korrelasjonskoeffisient
rpm	Rotasjoner per minutt
SD	Standardavvik
SVART	Svarthyllbær
TRAN	Tranebær
UVI	Urinveisinfeksjon
VAL	Legevendelrot
VP	VitaePro
ZEA	Zeaxanthin

Sammendrag

Introduksjon: I denne studien ble det kartlagt antikolinerg aktivitet, AA, i utvalgte naturpreparater og næringsmidler. Det var ønskelig å undersøke om denne typen preparater kan ha potensielle antikolinerge egenskaper, siden det ikke er blitt utført lignende studier tidligere, i tillegg til at det er godt dokumentert at mange legemidler kan utøve AA. Fysiologiske endringer gjør at eldre er mest utsatt for påvirkning av AA, og det kan føre til svekket hukommelse, redusert kognitiv funksjon og tilstand av *delir*.

Metode: Preparatene ble først og fremst valgt ut med tanke på hvor relevante de var for bruk hos eldre. Preparater som ble undersøkt var; VitaePro[®], lutein, zeaxanthin, astaxanthin, prikkperikum, legevendelrot, dvergpalme, søtlupin, bitterlupinbønner, svartsurbær, svarthyllbær, blåbær og tranebær.

Før AA kunne måles, måtte preparatene igjennom en prøveopparbeidelse hvor det ble utført ekstrahering med lipofile og hydrofile løsemidler, inndamping, sentrifugering og filtrering. Videre ble materialene løst i egnede løsemidler som var kompatible med løsningene brukt i metoden for å måle AA.

Metoden som ble benyttet for å måle AA, er et bioassay, opprinnelig utviklet for å måle AA i serum. I denne studien, var prøvematerialet ekstrakter i ikke-biologisk løsning. Metoden trengte av den grunn litt tilpasning for å fungere optimalt med dette prøvematerialet. Optimaliseringen innebar tilsetning av bovint serum albumin, BSA, til fosfatbufferen.

Alle preparatene ble først analysert med like betingelser innenfor de samme konsentrasjonsområdene. Videre ble AA målt i konsentrasjonskurver i de ekstraktene fra preparatene som tydelig viste AA ved første måling.

Resultater: Kosttilskuddet VitaePro[®], med innholdsstoffene astaxanthin, lutein og zeaxanthin, utøvde tydelig konsentrasjonsavhengig AA. I gruppen med beroligende og søvnfremmende midler, viste både prikkperikum og legevendelrot tydelige tegn til AA, og

aktiviteten så ut til å være konsentrasjonsavhengig. AA ble også sett hos næringsmidlet bitterlupinbønner, mens søtlupin ikke utviste AA.

De fire bærsortene svartsurbær, svarthyllbær, blåbær og tranebær, viste ikke tegn til konsentrasjonsavhengig AA. Dvergpalme ga heller ingen tydelig hemming av spesifikk ligand.

Standardkurven med atropin i fosfatbuffer inkludert BSA, viste god kurvetilpasning til modellen for kompetitive bindingsmodeller.

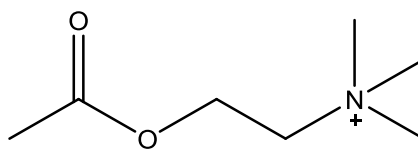
Konklusjon: Funnene i studien viser at flere av preparatene har potensielle antikolinerge egenskaper, deriblant VitaePro[®], prikkperikum, legevendelrot og bitterlupinbønner. Selv om det ikke er kjent om noen av preparatene oppnår konsentrasjoner i kroppen som gir relevant AA, kan resultatene dannet et grunnlag for hvilke preparater eldre bør være oppmerksomme på. VitaePro[®] viste ganske potent AA *in vitro*, og er definitivt et preparat som bør brukes med forsiktighet av eldre som er predisponert for redusert kognitiv funksjon.

1. Innledning

1.1 Kolinerg aktivitet

1.1.1 Acetylcholin

Acetylcholin, ACh, var den første nevrotransmitteren som ble kjent, og oppdagelsen ble gjort av Hunt i 1907 [1]. Han fant at ACh er en mediator for cellulære funksjoner. I 1914 fant Henry Dale videre ut at ACh har en respons som ligner parasympatisk nervestimulering, og i 1921 beviste Lewis at ACh er en nevrotransmitter [2]. ACh syntetiseres i ett enkelt trinn, katalysert av enzymet kolinacetyltransferase. Dette finner sted i terminalen i nervecellene [3]. Den kjemiske formelen for ACh presenteres i figur 1.1. ACh er vidt distribuert både i det sentrale og det perifere nervesystemet [1]. I sentralnervesystemet, CNS, er ACh hovedsakelig konsentrert i internevroner og i "long projection" nevroner. I striatum er de kolinerge internevronene viktige for blant annet kontrollering av ubevisst hukommelse og læring [1].



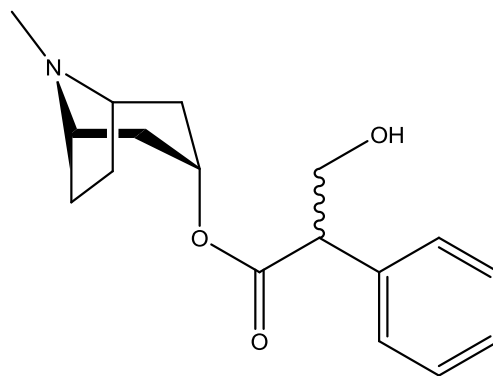
Figur 1.1: Kjemisk formel for acetylcholin

Tegnet i ChemDraw

ACh er neurotransmitter for to hovedklasser av kolinerge reseptorer, de muskarinerge og nikotinerge. De nikotinerge reseptorene er ligandbundne ionekanaler og kan deles inn i tre subgrupper. De muskulære reseptorene er plassert i nevro-muskulær "junction" i

skjelettmuskulatur, mens de ganglionære reseptorene er ansvarlige for transmisjon av signaler i de autonome gangliene [1, 3, 4].

ACh som nevrottransmitter i CNS, er viktig i kognitive prosesser som læring og hukommelse [4]. Blokkering av ACh med muskarinerge antagonister, kan blant annet gi nedsatt oppmerksomhet og svekket hukommelse [2]. Atropin er et naturlig alkaloid og en kjent muskarinerg antagonist. Atropin (figur 1.2) blokkerer for ACh ved binding til muskarinerge reseptorer i glatt muskulatur, hjertemuskel, endokrine kjertler, perifere ganglier og i CNS [2].



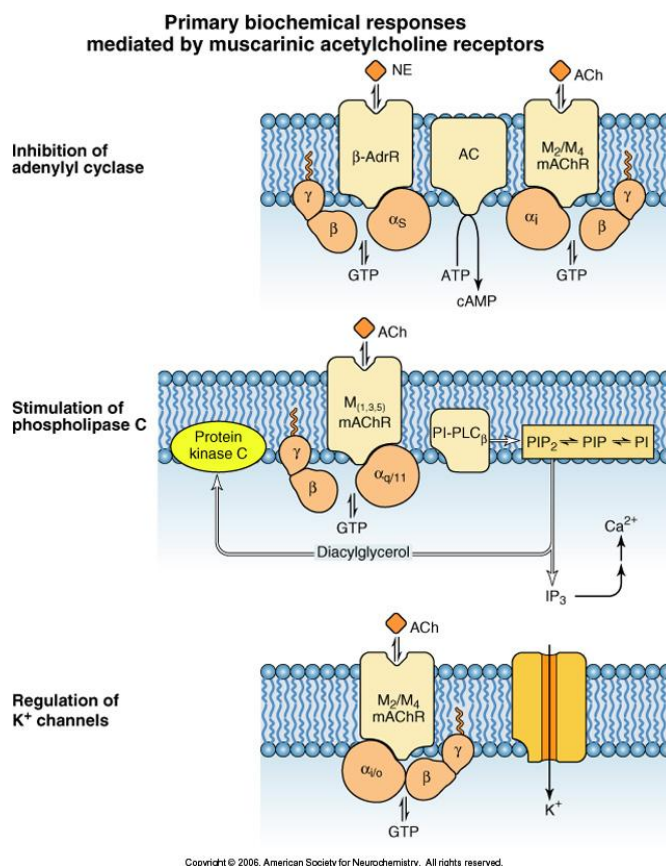
Figur 1.2: Kjemisk formel for atropin

Tegnet i ChemDraw

1.1.2 Muskarinerge reseptorer

Muskarinerge reseptorer, mAChR, tilhører gruppen av G-proteinkoblede-reseptorer, som kjennetegnes ved syv transmembrane domener, 7-TMD. Signalovertøringen skjer ved interaksjon mellom ulike GTP-bindende proteiner. Til nå er det identifisert fem isoformer av de muskarinerge reseptorene, kalt M₁-M₅, som hovedsakelig skilles ved at hver har et unikt domene intracellulært i loopen mellom det femte og sjette TMD [5]. Aminosyresekvensene er viktige for de spesifikke G-proteinkoblingene [1]

Ved aktivering av mAChR, kan det skje tre ulike biokjemiske responser; hemming av adenylyl syklase, stimulering av fosfolipase C og regulering av K^+ -kanaler. Hemming av adenylyl syklase skjer når ACh binder seg til reseptorene M_2 eller M_4 , og aktiverer et hemmende GTP-bindende protein, G_i . Fosfolipase C aktiveres ved interaksjon med det GTP-bindende proteinet $G_{q/11}$, når ACh binder seg til reseptorene M_1 , M_3 eller M_5 . Aktivering av fosfolipase C fører til økt inositol 1,4,5-trifosfat (IP_3) og diacylglycerol (DAG), som videre gir økt intracellulær konsentrasjon av Ca^{2+} . Muskarinerge agonister gir en rask aktivering av G-proteinkoblede kaliumkanaler (GIRKs), gjennom $\beta\gamma$ -enheten til G_i eller G_o . Denne reguleringen skjer via reseptorene M_2 eller M_4 . [1] De primære, biologiske reguleringene via mAChR er beskrevet i figur 1.3.



Figur 1.3: Oversikt over primære biologisk responser som medieres via muskarinerge acetylcholin reseptorer

Hentet fra: Basic Neurochemistry [1]

De muskarinerge reseptorene er ansvarlige for postganglionær- og parasympatisk nevrotransmisjon, og de kontrollerer en stor del av glatt muskulatur, hjertemuskel og sekretoriske responser i kroppen. Alle subtypene av mAChR er representert i hjernen, hvor M_1 -reseptorene hovedsakelig er lokalisert i hippocampus og i cerebral cortex. M_2 -reseptorene er hovedsakelig plassert i cerebellum og i hjernestammen, mens M_4 -reseptorene befinner seg i striatum. Det er mindre av M_3 - og M_5 -reseptorene i CNS og deres rolle er fortsatt ikke fullstendig klarlagt. Studier på ”knock-out”-mus som mangler mAChR, viser at reseptorene er viktige i forbindelse med flere sykdommer i CNS, blant annet Alzheimers, Parkinson og epilepsi [1, 6].

1.2 Antikolinerg aktivitet, AA, av legemidler

Det skjer generelt en nedgang i kognitiv aktivitet når man blir eldre. Denne nedgangen er først og fremst relatert til naturlige endringer i CNS, men redusert kognitiv funksjon kan også i noen tilfeller skyldes bruk av medisiner med antikolinerg aktivitet, AA [7]. Det er sett at permeabiliteten til blod-hjerne-barrieren, BHB, øker med alderen. Dette gjør at legemidler som normalt ikke passerer, lettere vil kunne gå over BHB og påvirke funksjoner i CNS [8].

Det er kjent at legemidler kan utøve AA, og bruk av legemidler med antikolinerge egenskaper, har vist seg å svekke ulike kognitive funksjoner som arbeidshukommelse, hendelseshukommelse og utførelse av praktiske oppgaver i hverdagen [7, 9]. I verste fall kan pasienter utvikle *delir* som følge av legemidler med AA [7, 9]. Det er vanskelig å forutsi hvem som har størst risiko for å få slike bivirkninger basert på legemiddelbehandlingen til hver enkelt pasient, men Tune og Coyle utviklet i 1979-80 en metode for måling av totalt AA i serum. [7, 10, 11]. Hos eldre pasienter er serum AA vist å være assosiert med risiko for utvikling av *delir* og demens [11].

Det er ikke utenkelig at også naturmidler, kosttilskudd og næringsmidler kan inneha antikolinerge egenskaper, og at inntak kan bidra til å øke serum AA hos eldre legemiddelbrukere. I hvilken grad andre stoffer enn legemidler kan ha antikolinerge egenskaper, er ikke tidligere undersøkt og beskrevet i publisert litteratur. De utvalgte naturlegemidlene, naturmidlene, kosttilskuddene og næringsmidlene i denne studien, omtales i avsnittene nedenfor. Utvelgelsen er gjort med hensyn til relevans i forhold til bruk og mulige helseeffekter hos eldre. I tillegg er det valgt ut næringsmiddel hvor det er beskrevet symptomer på antikolinerg aktivitet etter inntak [12-14].

1.3 Naturlegemidler, naturmidler, kosttilskudd og næringsmidler

De utvalgte preparatene blir omtalt etter aktuelle bruksområder, og en oversikt kan sees i tabell 1.

Tabell 1: Oversikt over utvalgte preparater

Bruksområde	Preparat/stoff
Beroligende og søvnfremmende	Legevendelrot
	Prikkperikum
Styrkende for immunforsvaret	VitaePro®
	(Lutein,
	Zeaxanthin,
	Astaxanthin)
Bær med høyt innhold av antioksidanter	Blåbær
	Svarthyllbær
	Svartsurbær
	Tranebær
Prostataproblemer	Dvergpalme
Næringsmiddel	Lupinmel
	(søtlupin)
	Lupini-bønner (bitterlupinbønner)

1.3.1 Bær med høyt innhold av antioksidanter

Studier har vist at bær med mørke farger, som blåbær, svartsurbær og solbær, inneholder høye konsentrasjoner av forbindelser med antioksiderende egenskaper. De vanligste forbindelsene er vitamin C, antocyaniner, flavonoler, fenoliske syrer og tanniner. [15-17]. Studier viser at ekstrakter fra bær og frukt med fenoliske forbindelser, har en høyere antioksiderende aktivitet, enn mange renfremstilte fenolforbindelser og vitaminer. Antioksidantene har evnen til å kompleksbinde radikaler som DPPH*, ABTS* og OH*, superoksidradikaler og andre reaktive oksygenforbindelser. De er vist å hemme oksidering

av LDL-kolesterol og forhindre dannelsen av NO*-radikaler [15, 16]. Det er imidlertid usikkert om høyt tilskudd av antioksidanter over lengre tid, er helsebringende [18].

Bærpreparatene valgt ut i denne oppgaven har alle fått dokumentert et høyt innhold av antioksidanter [17, 19].

Svarthyllbær, Sambucus nigra L.

Svarthyllbær, *Sambucus nigra L.*, tilhører kaprifolfamilien, *Caprifoliaceae* [20].

Innfødte amerikanere brukte svarthyllbær først og fremst til behandling av feber og reumatiske plager [21]. Svarthyllbær inneholder antocyaniner, som hører inn under gruppen med flavonoider. Antocyaninene er viktige forbindelser som innehar antioksiderende egenskaper, og evne til å fungere som frie radikalfangere [22]. I tillegg inneholder svarthyllbær forbindelser som triterpener og fenoliske syrer [20].

Svartsurbær, Aronia melanocarpa

Svartsurbær, *Aronia melanocarpa*, hører inn under rosefamilien, *Rosaceae* [23, 24].

Svartsurbær er en rik kilde til antioksidanter, hovedsakelig representert som vitamin C, polyfenoler som antocyaniner, proantocyanidiner, fenoliske syrer, flavonoler og tanniner [15, 24]. De farmakologiske virkningsmekanismene til svartsurbær er ennå ikke fullstendig klarlagt [24].

Blåbær, Vaccinium myrtillus L.

Blåbær, *Vaccinium myrtillus L.*, tilhører lyngfamilien *Ericaceae*. [25-27]. Blåbær inneholder antocyaniner, proantocyanidiner, fenoliske syrer, tanniner, flavonolglykosider, flavonoler, iridoider, terpener, pektiner og organiske plantesyre. Blåbær er en av de bærsortene hvor det er funnet et høyt innhold av antocyaniner og flavonoider [17]. Det er identifisert mer enn 15 ulike antocyaniner i ekstrakter fra blåbær, som har vist å ha antioksiderende egenskaper [26].

Amerikanske tranebær, *Vaccinium macrocarpon*

Amerikanske tranebær, *Vaccinium macrocarpon*, hører til lyngfamilien, Ericaceae. I dag blir amerikanske tranebær brukt i behandlingen av plager og infeksjoner i de nedre urinveier (UVI) [28, 29]. Tranebær har et høyt innhold av tanniner og flavonoider. Antocyaninene og proantocyanidinene har viktige antioksiderende egenskaper. Det er fortsatt mye ukjent rundt virkningsmekanismene til tranebær, men den antimikrobielle effekten er knyttet til proantocyanidinene [15, 20, 28, 30, 31].

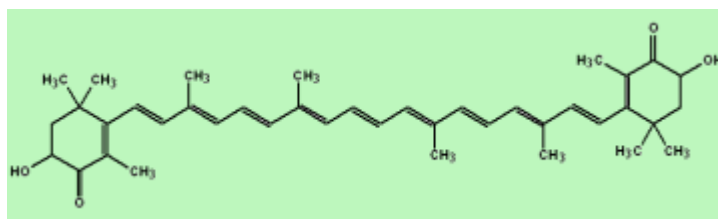
1.3.2 Kosttilskudd, styrkende for immunforsvaret

VitaePro®

VitaePro® er et kosttilskudd og inneholder de tre antioksidantene lutein, zeaxantin og astaxantin. Den røde antioksidanten astaxantin kommer fra ferskvannsalgen, *Haematococcus pluvialis*. De gule antioksidantene lutein og zeaxantin kommer fra stor fløyelsblomst, *Tagetes erecta* [32].

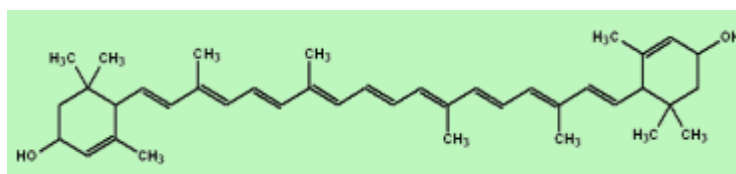
Lutein, zeaxanthin og astaxanthin

Lutein og zeaxanthin er strukturelle isomerer som hører til gruppen xantofyller, en av to undergrupper av karotenoidene. Lutein (figur 1.5) og zeaxanthin oppkonsentreres hovedsakelig i den gule flekken, *macula lutea*, i øyet. Kroppen kan ikke syntetisere lutein selv, så det må tilføres via kosten [33, 34]. Det foreligger sterke hypoteser om at lutein og zeaxantin kan beskytte mot aldersrelaterte sykdommer i øyet [33]. Astaxanthin (figur 1.4) er et oxykarotenoid og tilhører tetraterpenene. Tetraterpener er generelt sterke antioksidanter [20]. Studier har vist at astaxanthin har mer potente antioksiderende egenskaper enn β -karoten og α -tokoferol. Det er også blitt vist at astaxantin kan øke immunresponsen, nedsette antall biomarkører for DNA-skade og redusere inflammasjon [35].



Figur 1.4: Kjemisk formel astaxanthin

Hentet fra: <http://www.phytochemicals.info/phytochemicals/astaxanthin.php>



Figur 1.5: Kjemisk formel lutein

Hentet fra: <http://www.phytochemicals.info/phytochemicals/lutein.php>

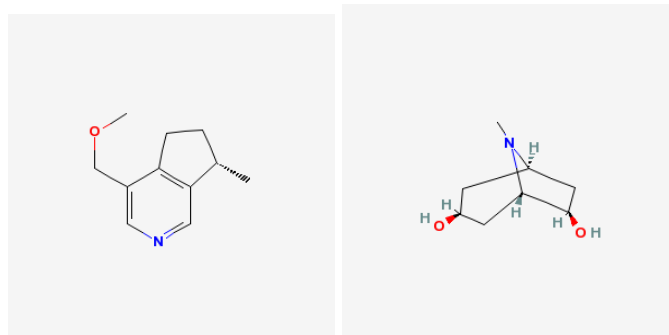
1.3.3 Beroligende / søvnfremmende preparater

Prikkperikum, Hypericum Perforatum L.

Prikkperikum, (*Hypericum Perforatum L.*), hører til familien *Hypericaceae/Clusiaceae* [36, 37]. Kjente innholdsstoffer i Prikkperikum er dianthronderivatene hypericin og pseudohypericin, flavonoler, xantoner, kumariner, fenoliske karboksylsyrer, floroglucinolderivater (hyperforin), flavonoider, monoterpener, seskviterpener, n-alkaner, n-alkanoler, karotenoider og essensielle oljekomponenter [20, 36, 37]. Prikkperikum er en av de vanligste urtene på markedet, og de medisinske egenskapene er blitt benyttet i flere hundre år [38]. I dag brukes urten først og fremst som et beroligende middel og til behandling av milde depresjoner [37, 38]. Forskere tror at den antidepressive effekten kan knyttes til hypericin og hyperforin [39].

Legevendelrot, Valeriana officinalis

Legevendelrot, *Valeriana officinalis*, tilhører familien Valerinaceae [40, 41]. De eksakte virkestoffene i legevendelrot er fortsatt ikke fullstendig klarlagt, men det er til nå identifisert mer enn 150 ulike forbindelser [40, 42]. Legevendelrot inneholder en gruppe av iridoider, kalt valepotriater. Molekylene inneholder isovaltratester og en epoksigruppe, som sannsynligvis er ansvarlige for cytotoxisiteten av valtrat og didrovaltrat som er sett *in vitro*. I tillegg inneholder legevendelrot flyktige oljer, alkaloider som valerianin og valerin, og aminosyrer som glutamin og γ -aminobutyrtsyre [20, 41-43]. Figurene til valerianin og valerin er presentert i figur 1.6. Legevendelrot er blitt brukt i tradisjonell medisin i tusener av år, først og fremst som et beroligende og søvnfremmende middel [40, 42]. I dag er det et av de reseptfrie preparatene mot søvnforstyrrelser, som er mest i bruk [42].



Figur 1.6: Kjemisk formel for valerianin til venstre og valerin til høyre

Hentet fra: http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/summary/summary.cgi?sid=53086590&loc=es_rss

1.3.4 Prostataproblemer

Dvergpalme, Serenoa repens

Dvergpalme (*Serenoa repens*), hører til palmefamilien *Palmeceae* [44, 45]. Det er fruktene, *Sabal fructus*, som blir anvendt i medisinske sammenhenger. Disse inneholder ulike fettsyrer, fytosteroler som β -sitosterol, langkjedede alkoholer og høyvekts polysakkarider

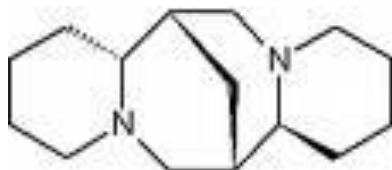
[20]. Den farmakologiske effekten er blitt studert over lengre tid, men de eksakte virkningsmekanismene er fremdeles ikke klarlagt [45]. I dag blir dvergpalme hovedsakelig brukt mot godartet forstørrelse av prostatakjertelen, benign prostata hyperplasi (BPH) [44-46].

1.3.5 Næringsmidler

Lupin

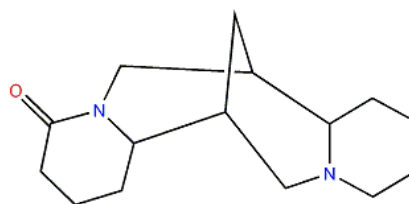
Viltvoksende lupin, *Lupinus albus*, hører til familien *Leguminosae*, som har over 500 ulike arter. *L. albus*, *L. luteus* og *L. angustifolius* er de tre vanligste artene som blir dyrket i dag [13]. Lupin inneholder i utgangspunktet høye konsentrasjoner av alkaloider. Disse alkaloidene er toksiske og er en viktig del av plantens naturlige beskyttelse [47-49]. Spartein (figur 1.7) og lupanin (figur 1.8) er to av de identifiserte alkaloidene i lupin, og tilhører gruppen med quinolizidiner. Begge er vist å ha effekt på det autonome nervesystemet som fører til tap av motorisk koordinasjon og muskulær kontroll. Dette inkluderer ganglionær blokkering og antimuskarinerge effekter [49, 50].

Bønnene fra lupinplanten, heretter kalt ”bitterlupinbønner”, blir brukt som næringsmiddel både til mennesker og dyr. Men før bønnene kan spises, er det nødvendig å følge en tilberedningsprosess for å fjerne det meste av de bitre alkaloidene [47, 48, 51]. For å unngå problemet med alkaloidene er det i de senere årene blitt dyrket frem en variant et mye lavere innhold av alkaloider. Denne er kjent som ”søtlupin”, og brukes i stadig større grad som næringsmiddel i form av mel og snacks.[13] I oppgaven omtales heretter lupinmel som ”søtlupin”.



Sparteín

Figur 1.7: *Kjemisk formel spartein*



Lupanin

Figur 1.8: *Kjemisk formel lupanin*

Hentet fra: chemistry.about.com

2. Hensikt med oppgaven

Det er kjent at mange legemidler utøver antikolinerg aktivitet, AA, og at den eldre delen av befolkningen er utsatt for få bivirkninger etter påvirkning [7, 52]. Det er utviklet et bioassay for å måle AA i serum og dette er optimalisert for å måle AA i små volum [10, 53].

Hensikten med denne oppgaven var å kartlegge antikolinerg aktivitet i ulike naturpreparater og næringsmidler ved hjelp av denne metoden. I første rekke var det aktuelt å undersøke preparater som blir brukt av eldre, men det var av interesse å finne ut om vanlige næringsmidler også kunne utvise antikolinerge egenskaper.

3. Metoder og materialer

3.1 Generelle metoder

3.1.1 Vannkvalitet

Det ble benyttet destillert vann, rensset med Elix[®] Millipore med Progard[®] 2 w/o polyfenolfilter.

3.1.2 Innveiing av stoff

Analysevekter som ble benyttet ved innveiing av materiale er listet opp i tabell 3.1.

Tabell 3.1: *Oversikt over analysevekter*

Navn på vekt	Mengder som ble veid	Veieområdet
Mettler Toledo PB 3002	50-1500 gram	0,01-3100 gram
Acculab Sartorius Group	10-150 gram	0,1-210 gram
EC-211		
Sartorius BP 221S	0-10 gram	0,001-200 gram

3.1.3 Blanding av små volum

For å sikre at alt stoff ble ordentlig løst i de aktuelle løsemidlene, ble alle løsninger blandet i minst 15 sekunder på whirlmikser. Tabell 3.2 viser ulike whirlmikser som ble benyttet.

Tabell 3.2: *Oversikt over whirlmikser*

Navn	Leverandør
MS2 Minishaker IKA®	IKA
BioVortex V1 (whirlmikser)	Montebello Diagnostistics A/S, Oslo

3.1.4 Frysetørking

Prinsipp

Frysetørking er en metode som brukes for å fjerne vann fra frosset materiale. Dette blir gjort ved temperaturer under 0 °C og må skje ved et lavere trykk enn metningstrykket til is.

Vanndampen som dannes, fjernes ofte ved utfrysning på kald overflate [54].

Utstyr

Fryser -20 °C

Metanolbad -40 °C, Hetofrig (Heto Birkerød, Danmark)

Frysetørker, Alpha I-6 CHRIST (Vakuum-Service AS, Lørenskog)

Rundkolbe

Prosedyre for frysetørking av bær

1. Materiale ble knust i morter eller klippet i stykker og overført til rundkolber.

2. Rundkolbe med materiale ble satt i fryser til innfrysing, og deretter i metanolbad om nødvendig.
3. Fryst materiale ble satt på frysetørker og ble stående til materialet var tørt.

Prosedyre for frysetørking av løsninger

1. Løsninger ble overført til rundkolber og fryst ned i metanolbad.
2. Rundkolbe med fryst løsning ble satt på frysetørkeren i 1-2 dager, til materialet var helt tørt.

3.1.5 Filtrering

Prinsipp

Filtrering er en metode som blir brukt for å fjerne små, uløste partikler fra en løsning.

Utstyr

Nutsj med vannsug

Filterpapir, Whatman Qualitative 1, medium fast, medium chrystalline 9,0 cm (Whatman, England)

Filterpapir, S & S Rundfilter 150 mm Ø (Sleider & Schull)

Glassfiberfilter, Acrodisc[®] Syringe Filters 1 µm glassfibermembran (Pall Life Science)

Engangssprøyte 5,0 ml (Plastipak)

Erlenmeyerkolbe med utløp for vannsug

Renset vann

Prosedyre

1. Råekstraktene ble filtrert gjennom S & S Rundfilter ved hjelp av glasstrakt.

2. Supernatanten av 50 % etanolekstraktene ble filtrert gjennom dobbelt filterpapir ved hjelp av nutsj og vannsug.
3. De prøvene som ble gelfiltrert og ionekromatografert, ble på forhånd filtrert gjennom glassfiberfilter ved hjelp av en engangssprøyte.

3.1.6 Ekstraksjon med Soxhlet

Prinsipp

Ved ekstraksjon med Soxhlet, er det mulig å trekke ikke-flyktige, kjemiske komponenter ut fra faste stoffer. Dette skjer ved at organiske løsemidler blir varmet opp til kokepunktet slik at de fordamper. Deretter kjøles dampen ned igjen på en tilbakeløpskjøler. Væsken samles i beholderen hvor filteret med materialet er plassert. Slik ekstraheres komponenter løselige i det aktuelle løsemiddelet. Ekstraksjonen kan gjøres med lipofile løsemidler som løser upolare komponenter, eller med hydrofile løsemidler for å løse polare forbindelser. Ekstraktet samles opp i den samme rundkolben som opprinnelig inneholdt rent løsemiddel. Det samme løsemidlet blir oppvarmet på nytt og fordamper igjen. Siden det er et lukket system, går ekstraksjonen kontinuerlig så lenge det tilføres varme [20, 55].

Materiale

Tørket materiale av bær og droger

Utstyr

Soxhlet-ekstraktor med tilbakeløpskjøler

Filter til bruk i soxhlet-ekstraktor

Varmemantel, Electrothermal (Elektrothermal, London) eller

Labmaster Isopad (KEBO LabAB, Stockholm)

Rundkolbe, 2000 ml

Aluminiumsfolie

Prosedyre

1. Filter til soxhlet-ekstraktor med innveid materiale ble plassert i ekstraktoren, og rundkolben ble fylt med organisk løsemiddel.
2. Rundkolben ble satt i varmemantelen og tildekket med aluminiumsfolie for å forhindre støtkoking på grunn av ujevn varme.
3. Kjølevannet og varmen ble skrudd på, og materialet ble ekstrahert over en tilstrekkelig tidsperiode, gjerne til ekstraksjonsløsningen var fargeløs, avhengig av løsemiddel og materiale som ble ekstrahert.

3.1.7 Sentrifugering

Prinsipp

Sentrifugering blir brukt for å sedimentere uløst materiale i en løsning. Dette skjer ved rotasjon med svært høy hastighet i lukket beholder.

Materiale

50 % etanolekstrakt av bær og droger

Utstyr

Sentrifugebeholder i plast med skrulokk, 1000 ml

Sentrifuge, Multifuge KR Heraeus Kendro, (Tamro)

Prosedyre

1. Ekstraktene ble fylt i separate sentrifugebeholdere med skrulokk, og veid.
2. Hvert ekstrakt ble sentrifugert i 20 minutter med 4000 rotasjoner per minutt ved 8 °C.

3.1.8 Inndamping på rotavapor

Prinsipp

Rotavapor blir brukt til inndamping av ekstrakter og løsninger til tørt stoff. Dette skjer i vakuum og ved oppvarming av det som skal dampes inn, i et lukket system. Trykket senkes og løsemiddel fordamper. Dampen avkjøles i en tilbakeløpskjøler og rennende væske samles i en separat beholder.

Materiale

Ekstrakter av bær, droger og næringsmidler

Utstyr

Rotavapor

Rundkolbe

Prosedyre

Ekstrakt ble fylt over i en tarert rundkolbe og løsningsmidlet ble dampet inn til tørrhet, eller til et bestemt antall ml.

3.2 Tilbereding av preparater til måling av antikolinerg aktivitet, AA

3.2.1 Tilbereding av bærmateriale

Bær må knuses og tørkes slik at materialet blir pulverisert, før det kan ekstraheres med ulike løsemidler. Dette for å få en mest mulig effektiv ekstrahering av det aktuelle materialet.

Materiale

Frosne Svartsurbær

Frosne Blåbær

Frosne Tranebær

Utstyr

Stor morter og pistill

Saks

Begerglass 2000 ml

Rundkolbe 2000 ml

Prosedyre

1. Frosne bær ble knust i morter, eller klippet i stykker, og overført til en rundkolbe.
2. Det knuste bærmaterialet ble satt i fryser til innfrysing i 1 døgn.
3. Fryst bærmateriale ble satt til frysetørking i 6 døgn, til det var helt tørt.
4. Det tørkede bærmaterialet ble finknust i morter, før det ble veid inn.

Materialet av svarthyllbær var allerede tilberedt av tidligere doktorgradsstudent, Torun Helene Aslaksen.

3.2.2 Tilbereding av kosttilskudd

Kosttilskuddet VitaePro er kapsler, som inneholder en flytende løsning med de tre antioksidantene lutein, astaxanthin og zeaxanthin. Innholdet i VitaePro ble løst direkte opp i egnet løsemiddel, metanol. Tørt stoff av lutein, zeaxanthin og astaxanthin, ble løst og fortynnet hver for seg. Innveide mengder er satt opp i tabell 3.3.

Materiale

Tabell 3.3: Oversikt over innveide mengder til stamløsninger

Navn	Innveid mengde
VitaePro kapsler	0,0954 g
Lutein (Xanthophyll)	0,0011 g
Zeaxanthin	0,0010 g
Astaxanthin	0,0025 g

Reagens

Metanol (Sigma-Aldrich)

Prosedyre

1. To VitaePro®-kapsler ble skjært opp med kniv. Innholdet ble klemt ut av kapslene og samlet i et eppendorfrør, 2,0 ml

2. Det oppsamlede innholdet ble veid, og metanol ble tilsatt slik at løsningen fikk en konsentrasjon på 1000 mg/ml.
3. Løsningen ble mikset på whirlmikser til alt var oppløst og deretter satt i kjøleskap til oppbevaring.
4. Lutein, zeaxanthin og astaxanthin ble veid inn, og metanol ble tilsatt slik at alle tre løsningene fikk en konsentrasjon på 10 mg/ml. Alle løsningene ble mikset på whirlmikser til alt var oppløst, og deretter satt i kjøleskap til oppbevaring.

3.2.3 Tilbereding av bitterlupinbønner for ekstrahering

Bitterlupinbønnene ble kjøpt hele med skall og de var tørre. Før bønnene ble ekstrahert, ble de knust og malt til et grovkornet pulver. Dette for å sikre at alt materialet kunne ekstraheres.

Materiale

Hele, tørkede bitterlupinbønner

Utstyr

Kvern, Alpine Augsburg (Christian Berner AS, Oslo)

Prosedyre

1. Bitterlupinbønner, ca.200 g, ble knust og pulverisert ved hjelp av en kvern.

3.2.4 Tilbereding av bitterlupinbønner

Varianten av lupinbønner, som blir kalt bitterlupin, har et høyt innhold av alkaloider. Alkaloidene gir bønnene en bitter smak og de kan være toksiske i høye konsentrasjoner. Av denne grunn må bitterlupin bearbeides, slik at alkaloidene blir fjernet, før bruk som næringsmiddel. Mange alkaloider er naturlig alkaliske, men kan foreligge på saltform, eller inneholde sure komponenter. Alkaloider på baseform er generelt tungt løselig i kaldt vann, men løses når de foreligger på saltform og væsken har riktig pH [20, 51].

Da bitterlupinbønnene ble kjøpt, fulgte det med en bruksanvisning for hvordan de skulle tilberedes, før de kunne bli brukt som næringsmiddel [56]. Denne bruksanvisningen ble fulgt så godt det lot seg gjøre, med tanke på at det var løsningen hvor bønnene hadde ligget, som skulle bli brukt videre i oppgaven.

Materiale

Tørkede bitterlupinbønner med skall, (Purcell Mountain Farms, USA)

Reagens

Renset vann (FI)

Prosedyre

1. Materialet ble veid inn i begerglass og 200 ml destillert vann ble tilsatt. Innveid mengde materiale: 50,0 g.
2. Begerglasset ble dekket til med aluminiumsfolie og satt på kjølerom i tre døgn.
3. Alt innhold i begerglasset ble helt over i en liten kasserolle, og nye 200 ml med destillert vann ble tilsatt for å hindre tørrkoking av bønnene.
4. Bønnene ble kokt på svak varme, på en kokeplate (Elektra, Norge), i to timer og deretter avkjølt på benken.

5. Alt innholdet i kasserollen ble tømt tilbake i begerglasset, og enda 200 ml med destillert vann ble tilsatt.
6. Begerglasset ble tildekt med aluminiumsfolie og satt på kjølerom i tre dager.
7. Bønnene ble filtrert fra væsken, og væsken ble dampet inn til tørrhet på rotavapor og vannbad 40 °C.
8. Inndampet ekstrakt ble veid og satt til oppbevaring i kjøleskap.

3.2.5 Ekstraksjon med diklormetan

Prinsipp

Diklormetan vil ekstrahere ut de lipofile forbindelsene i de aktuelle materialene.

Materiale

Tørt materiale fra bær og droger. De preparatene som ble ekstrahert i denne oppgaven, er satt opp i tabell 3.4.

Tabell 3.4: Oversikt over preparatene som ble ekstrahert. Innveide mengder viser til tørt materiale før ekstrahering med diklormetan

Navn	Latinsk navn	Innveid mengde (gram)
Svartsurbær	<i>Aronia melanocarpa</i>	90,0
Svarthyllbær	<i>Substantia nigra</i>	60,0
Blåbær	<i>Vaccinium myrtillis</i>	63,2
Tranebær	<i>Vaccinium macrocarpon</i>	30,0
Søtlupin	<i>Lupinus albus,</i>	99,7
Bitterlupinbønner	<i>Lupinus termis</i>	96,3
Prikkperikum	<i>Hypericum Perforatum L</i>	99,8
Legevendelrot	<i>Valeriana officinalis</i>	99,6
Dvergpalme	<i>Serenoa repens</i>	99,0

Reagens

Diklormetan, 1500 ml (Merck)

Utstyr

Soxhletutstyr, se beskrivelse under generelle metoder.

Prosedyre

1. Rundkolbe på 2000 ml, ble fylt med 1500 ml diklormetan og plassert i varmemantel.
2. Innveid materiale ble ekstrahert ved bruk av Soxhlet.

3. Ekstraheringen ble avsluttet da løsningen som ble ekstrahert ut av materialet, var fargeløs.
4. Ekstraktet ble dampet inn til tørrhet på rotavapor og vannbad 20 °C.
5. Inndampingsresten som var seig og oljeaktig, ble veid og satt til oppbevaring i kjøleskap.

3.2.6 Ekstraksjon med 96 % Etanol

Prinsipp

Etanol er mindre polart enn rent vann, men er blandbar med vann i alle forhold. 96 % etanol har både lipofile og hydrofile egenskaper, slik de upolare komponentene som ikke ble med i diklormetaneekstraktet, kan ekstraheres ut her. I tillegg vil det være noen polare forbindelser som kan ekstraheres ut.

Materiale

Tørt restmateriale etter ekstraksjon med diklormetan.

Utstyr

Soxhletutstyr, se beskrivelse under generelle metoder.

Reagens

96 % etanol, 1500 ml (FI)

Prosedyre

1. Rundkolbe på 2000 ml, ble fylt med 1500 ml 96 % etanol og plassert i varmemantel.

2. Hvert restmateriale etter ekstraksjon med diklormetan, ble ekstrahert ved bruk av Soxhlet. Ekstraksjonstiden varierte mellom de ulike restmaterialene, alt fra 4-12 timer.
3. Løsemiddel ble dampet inn til tørrhet på rotavapor og vannbad 40 °C.
4. Inndampet ekstrakt ble veid og satt inn i kjøleskap til oppbevaring.

3.2.7 Ekstraksjon med 50 % etanol

Prinsipp

50 % etanol inneholder mer vann enn 96 % etanol og vil derfor kunne ekstrahere ut mer polare forbindelser enn 96 % etanol.

Materiale

Tørt restmateriale etter ekstraksjon med 96 % etanol.

Utstyr

Tilbakeløpskjøler

Varmemantel, Electrothermal (Elektrothermal, London) eller

Labmaster Isopad (KEBO LabAB, Stockholm)

Rundkolbe, 2000 ml

Aluminiumsfolie

Reagens

1000 ml 50 % etanol (FI)

Prosedyre

1. Restmateriale etter ekstraksjon med 96 % etanol ble overført til en rundkolbe på 200 ml, og 1000 ml 50 % etanol ble tilsatt.
2. Rundkolben ble plassert i varmemantel og tilbakeløpskjøler koblet til.
3. Hvert restmateriale ble ekstrahert ved koking i 2 timer og 30 minutter.
4. Avkjølt ekstrakt ble sentrifugert i 20 minutter med 4000 rpm ved 8,0 °C og supernatanten ble filtrert.
5. Filtratet ble dampet inn til tørrhet på rotavapor og vannbad 40 °C.
6. Inndampet ekstrakt ble veid og satt til oppbevaring i kjøleskap.

3.3 Målemetode for antikolinerg aktivitet, AA

3.3.1 Utstyr

Utstyr og materiale som ble brukt i forbindelse med radioreseptor bioassayet for å måle antikolinerg aktivitet, AA, er listet opp i tabell 3.5.

Tabell 3.5: Oversikt over utstyr og leverandører

Navn på utstyr/materiale	Leverandør
Millipore MultiScreen [®] HS; FC (microtiterplate, 96 brønner)	Millipore AS, Oslo
We Warm 1 (inkubator og shaker)	Denley
Bellydancer	Alfa-lab A/S, Oslo
Vacumcontroll (CP6EM4618B) (filtrering for microtiterplater)	Millipore AS, Oslo
ToppSeal [®] - A: 96-well microplates (tape)	PerkinElmer, Belgia
1450 Microbeta Plus, liquid scintillation counter	Wallac Sverige AS
SONOREX RK 100 (sonikeringsmaskin)	Bandelin
SevenEasy (pH-meter)	Mettler Toledo
Filterpapir, vandig 0,22 µm	Millipore
OptiPhase Supermix Cocktail (tellevæske)	PerkinElmer, Belgia

3.3.2 Metode for måling av AA

Metoden som ble brukt til måling av AA i de utvalgte preparatene, ble utviklet av Stine M. Jakobsen. Masteroppgaven ved Avdeling for farmasøytisk biovitenskap, Farmasøytisk Institutt ved Universitetet i Oslo, ble fullført våren 2009 [53].

Prinsippet til metoden

Metoden for å måle AA, utviklet av Tune og Coyle, er basert på kompetitiv fortrenning av en radioligand, tritiert quinuclidinyl benzilate, [³H]-QNB. Den fortynnes med umerket ligand og muskarinergt reseptorpreparat, tilberedt av rottehjerner fortynnet i fosfatbuffer [10]. Ved tilsetning av stoffer med antikolinerge egenskaper, vil mengden radioaktiv ligand bundet til muskarinerge reseptorer i rottehjerne, være et uttrykk for antikolinerg potens. I selve karakteriseringen av antikolinerg potens vil grad av ligandfortrenning med økende konsentrasjon av testpreparatet/substansen undersøkes [10].

Ved å plotte den totale bindingen av radioligand mot logaritmen av konsentrasjonen til den umerkede liganden, får man frem en kurve med IC₅₀-verdier.[57] Ligningen for kompetitive bindingskurver:

$$Y = \text{Bottom} + (\text{Top} - \text{Bottom}) / (1 + 10^{(X - \text{LogIC}_{50})}) \quad [57]$$

Bunn beskriver den uspesifikke bindingen når umerket ligand X har nådd metningskonsentrasjonen. *Topp* beskriver den totale bindingen av radioligand når umerket ligand er fraværende [58].

Tilpassing av metode for måling av AA i andre løsninger enn serum

Metoden som Jakobsen utarbeidet ble utviklet for å analysere serumprøver fra pasienter i en klinisk studie [53]. Følgelig ble standardkurvene for atropin til disse analysene laget med serum som matriks.

Ettersom det i denne oppgaven skulle testes naturpreparater som på forhånd var ekstrahert, eller løst direkte i egnet løsemiddel, ble det innledningsvis undersøkt om standardkurven med atropin ble omtrentlig lik den til Jakobsen ved bruk av en alternativ matriks. Det ble

først testet å løse atropin i fosfatbuffer (50 mM, pH 7,4) i samme konsentrasjonsområde som Jakobsen benyttet, men det viste seg at denne matriksen ikke ga en konsentrasjonsavhengig standardkurve for fortregning av liganden, [^3H]-QNB. Ved å tilsette bovint serum albumin, BSA, i konsentrasjonen 3 % til fosfatbufferen, fikk imidlertid standardkurven en fasong som stemmer overens med en konsentrasjonsavhengig fortregning av [^3H]-QNB (dette er ikke vist grafisk). Dataene for ligandfortregningen ble godt tilpasset modellen for såkalt "one site competitive inhibition", med R^2 -verdi for kurvetilpasning lik $0,95 (\pm 0,02)$, og den estimerte IC_{50} -verdien for atropinhemmingen ble i tråd med Jakobsens resultater: IC_{50} -estimat \pm standardavvik, SD, ble lik $1,9 \pm 0,3 \text{ nM}$ i tilpasset metode, sammenlignet med $2,6 \pm 0,7 \text{ nM}$ i opprinnelig metode.

Basert på denne evalueringen ble fosfatbufferen med 3 % BSA benyttet som matriks for testing av AA i naturpreparatene og næringsmidlene, valgt ut i oppgaven.

Utstyr

Utstyr som ble benyttet er listet opp i tabell 3.5.

Sammensetning i inkubasjonsmiksturen

Tabell 3.6: Rekkefølgen på tilsettingen og mengden av de ulike løsningene i inkubasjonsmiksturen

Navn på komponent	Mengde (μl)
1.Fosfatbuffer 50 mM inkl. 3 % BSA	60
2.Prøveløsning	20
3.[^3H]-QNB-bruksløsning (1,89 pmol/ml)	80
4.Muskarinergt reseptorpreparat	80

Prosedyre

1. Alle løsninger ble satt på is før oppstart, og ubrukne brønner ble dekket med blank tape.
2. Filteret i brønnene ble fuktet med 100 µl fosfatbuffer 50 mM, som stod i brønnene i ett minutt før utfiltrering. Prosessen ble gjentatt en gang.
3. Blank tape ble festet på baksiden av microtiterplaten.
4. Komponentene i inkubasjonsmiksturen ble tilsatt i hver brønn i samme rekkefølge som listet opp i tabell 3.6.
5. Hele microtiterplaten ble dekket med blank tape og inkubert på shaker i 60 minutter i romtemperatur.
6. Inkubasjonsmiksturen ble filtrert ut og brønnene ble vasket seks ganger med 100 µl kald fosfatbuffer.
7. Etter den sjette vasken, ble vakuemet opprettholdt til filtrerne var omtrent tørre, ca. fem minutter.
8. Blank tape ble festet på undersiden av microtiterplaten, og 30 µl tellervæske ble tilsatt i hver brønn.
9. Blank tape ble festet på oversiden av microtiterplaten, og platen ble satt til risting på ”BellyDancer” i ca. 30 minutter.
10. Platen ble satt inn i ”1450 Microbeta Plus, liquid scintillation counter” og radioreseptorligand-kompleksene ble telt (CCPM).

3.3.3 Databehandling

Til å behandle resultatene fra tellingen i 1450 MicroBeta Plus, ble det benyttet både Microsoft Office Excel 2007 og GraphPad Prism 5 (GraphPad Software). Resultatene ble først bearbeidet i Excel, før de ble ført over til GraphPad Prism 5. Her ble data analysert ved hjelp av XY-nonlinear regresjonsanalyse. Analysene ble presentert i grafer, hvor kurven ble

tilpasset ved hjelp av ligningen ”one site competition”. I tillegg ble data presentert i stolpediagram hvor det ble vist grad av hemming i forhold til kontrollprøve.

Validering av metoden

Validering av metoden ble utført med standardkurver hvor atropin var analysert i relevant konsentrasjonsområde. I følge retningslinjene for bruk av standardkurver i bioanalytiske metoder, bør kurven inneholde 4-6 ulike konsentrasjoner i det aktuelle konsentrasjonsintervallet [59]. Her ble det valgt 10-12 ulike konsentrasjoner av atropin. Hver konsentrasjon ble analysert i to paralleller ved hver måling, på tre ulike dager, totalt seks paralleller. Verdiene som ble tatt hensyn til var; Regresjonskoeffisienten, R^2 , IC_{50} -verdiene, total binding (*topp*) og uspesifikk binding (*bunn*).

3.3.4 Standardkurve med atropin

Til standardkurven ble det laget 12 ulike løsninger med atropin i konsentrasjonsintervallet 0,048 nM til 1200 nM, i inkubasjonsmiksturen. Dette var det samme konsentrasjonsintervallet som Jacobsen benyttet i sin oppgave [53]. I stamløsningene og mellomløsningene, ble atropin løst i renset vann. Prøveløsningene til standardkurven ble laget av uttak fra mellomløsningene som videre ble fortynnet med fosfatbuffer 50 mM inkludert BSA. Fortynningen i prøveløsningene hadde forholdet 20:80 med mellomløsning:fosfatbuffer. Det samme forholdet som prøveløsningene hvor det ble målt AA hadde.

Utstyr og reagenser

Atropinsulfatmonohydrat, $(C_{17}H_{23}NO_3)_2 \cdot H_2SO_4 \cdot H_2O$, $M_w = 694,85$ g/mol, (Fluka)

Eppendorfrør, 1,5 ml

Prøverør med skrulokk, 4,0 ml

Renset vann (FI)

Fosfatbuffer 50 mM inkludert 3 % BSA

Is

Aluminiumsfolie

Stamløsninger med atropin

Tabell 3.7: Oversikt over de stamløsningene som ble laget:

Navn på løsning, volum	Konsentrasjon
Atropin 10 mM i H ₂ O, 2 ml	10 mM
Atropin 0,1 mM i H ₂ O, 2 ml	0,1 mM
Atropin 1,0 µM i H ₂ O, 2 ml	1,0 µM
Atropin 0,5 µM i H ₂ O, 2 ml	0,5 µM

Prosedyre

1. I "Atropin 10 mM i H₂O, 2 ml", ble atropinsulfat monohydrat veid inn og tilsatt rensset vann til en konsentrasjon lik 10 mM. Løsningen ble mikset på whirlmikser i 15 sekunder.
2. De andre stamløsningene ble laget av uttak fra "Atropin 10 mM i H₂O, 2 ml", som ble fortynnet med rensset vann. Alle løsningene ble mikset på whirlmikser i 15 sekunder etter fortynning.
3. Stamløsningene (tabell 3.7) ble pakket inn i aluminiumsfolie og oppbevart på is underveis. De ble nedfrost ved -20 °C med det samme de var ferdige.

Mellomløsninger og prøveløsninger med atropin**Tabell 3.8:** Oversikt over atropinløsningene og konsentrasjoner:

Mellomløsninger (μM)	Prøveløsninger (nM)	Konsentrasjon inkubasjonsmiksturen (nM)
6,0	1200	100
3,0	600	50
1,5	300	25
0,75	150	12,5
0,375	75	6,25
0,185	37,5	3,125
0,094	18,75	1,562
0,047	9,37	0,791
0,023	4,68	0,391
0,012	2,34	0,195
0,006	1,17	0,097
0,003	0,58	0,048

Prosedyre

- 12 μl ble tatt ut fra stamløsning "Atropin 1mM i H_2O 2 ml", overført til mellomløsning "6,0 μM " og fortynnet med renset vann til en konsentrasjon lik 6,0 μM .
- De andre mellomløsningene (tabell 3.8) ble laget i en fortynningsrekke fra "6,0 μM ". Alle mellomløsningene ble fortynnet med renset vann.

3. Prøveløsningene (tabell 3.8) ble laget ved å ta ut 40 µl fra mellomløsning og tilsatt 160 µl fosfatbuffer 50 mM inkludert BSA, det vil si at forholdet ble lik 1:4 med prøve:fosfatbuffer.
4. Alle løsningene stod på is og ble mikset i 15 sekunder på whirlmikser og lagt i fryser ved -20 °C like etter fortynning.

3.3.5 Fosfatbuffer

I metoden for måling av AA, ble det brukt fosfatbuffer 50 mM, med pH lik 7,7.

Utstyr

Målekolbe

Målesylinder

Erlenmeyerkolbe med utgang for vannsug og glasstrakt

Vandig filterpapir 0,22 µm,

pH-meter

Begerglass og magnetrører

Reagenser

Renset vann (FI)

Natrium dihydrogenfosfat ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), (AnalaR)

NaOH 1 M og 5 M (Natriumhydroksidæ/renset vann, AnalaR/FI)

Prosedyre

1. Natrium dihydrogenfosfat ble veid inn og løst opp i renset vann til en konsentrasjon lik 50 mM.

2. Ved hjelp av NaOH 1 M og 5 M, ble pH justert til 7,7. Lest av på pH-meter.
3. Løsningen ble filtrert på vannsug og oppbevart i kjøleskap.

3.3.6 [^3H]-QNB- løsning

I bioassayet til måling av AA, ble *l*-Quinuclidinyl[phenyl-4- ^3H]benzilate, [^3H]-QNB, benyttet som radioaktivt merket muskarinerg ligand. Den opprinnelige løsningen hadde en radioaktiv konsentrasjon på 1,0 mCi/ml, med en spesifikk aktivitet på 48,0 Ci/mmol og en radioaktiv mengde på 250 μCi . Dette tilsvarer 20833 pmol/ml, og løsningen måtte derfor fortynnes i flere omganger for å få konsentrasjonen 1,8 pmol/ml, som ble brukt i inkubasjonsmiksturen (tabell 3.9).

Tabell 3.9: Konsentrasjoner i de ulike løsningene med [^3H]-QNB

Navn på løsning	Konsentrasjon (pmol/ml)
Opprinnelig løsning	20833
Mellomløsning	180
Bruksløsning	1,89

Utstyr og reagenser

l-Quinuclidinyl[phenyl-4- ^3H]benzilate, [^3H]-QNB (GE Healthcare Amersham, UK)

Prøverør i plast med skrulokk, 14 ml

Fosfatbuffer 50 mM

Prosedyre

1. I mellomløsningen ble opprinnelig løsning fortynnet med fosfatbuffer 50 mM, til en konsentrasjon på 180 pmol/ml.
2. I bruksløsningen ble mellomløsning fortynnet med fosfatbuffer 50 mM, til en konsentrasjon på 1,89 pmol/ml.
3. Alle løsningene ble mikset på whirlmikser og oppbevart i fryser ved -20 °C.

3.3.7 Muskarinergt reseptorpreparat

Utstyr og reagenser

Cerebellum, ca. 20 stykker

Prøverør i plast med skrulokk, 14 ml

Pinsett

Fosfatbuffer 50 mM

Sonikeringsutstyr

Konsentrert reseptorpreparat

Rottehjerner, nærmere bestemt cerebellum, ble benyttet til å lage det konsentrerte, muskarinerge reseptorpreparatet. Hjernene ble tatt ut av rotter, avlivet ved Avdeling for farmasøytisk biovitenskap, ved Universitet i Oslo. Fosfatbufferen og rottehjernene ble oppbevart på is til enhver tid under hele tilberedningen.

Prosedyre

1. Rottene hadde vært døde i 10-15 minutter og lillehjernen var fjernet, da reseptorpreparatet ble laget. Cerebellum ble tatt ut ved hjelp av pinsett, og overført til prøverør i plast med lokk.

2. Hjernemassen ble veid og fosfatbuffer 50 mM ble tilsatt i forholdet 1 g hjernemasse per 10 ml fosfatbuffer.
3. Løsningen ble sonikert til en homogen masse. Dette tok 40-45 sekunder med en amplitude på 50.
4. Den konsentrerte løsningen ble oppbevart i fryser, -70 °C.

Fortynnet løsning

For å få ønsket konsentrasjon i det reseptorpreparatet som ble benyttet i inkubasjonsmiksturen, ble det konsentrerte reseptorpreparatet fortynnet med fosfatbuffer 50 mM i forholdet 1:10. Det fortynnete preparatet ble blandet forsiktig på whirlmikser og oppbevart i fryser -20 °C.

3.3.8 Fosfatbuffer med BSA

Som beskrevet i avsnitt, 3.3.2, om tilpasning av metode under kapittel om metoder og materialer, ble det funnet at metoden fungerte best når fosfatbufferen ble tilsatt BSA i en konsentrasjon på 3 %. Fosfatbuffer 50 mM inkludert 3 % BSA ble brukt til fortynning av alle prøveløsninger som ble analysert.

Utstyr og reagenser

Fosfatbuffer 50 mM

Albumin from Bovine Serum, Essentially fatty acid free, BSA (Sigma-Aldrich, USA)

Prøverør i plast med skrulokk, 14 ml

Prosedyre

1. BSA ble veid inn, og ren fosfatbuffer 50 mM, ble tilsatt til en konsentrasjon lik 3 %.
2. Løsningen ble mikset godt på whirlmikser og oppbevart i fryser -20 °C

3.3.9 Preparater til analyse

Materiale

Preparatene som ble undersøkt for antikolinerg aktivitet, AA, er presentert i tabe

Tabell 3.10: Oversikt over alle preparater med leverandører, som ble undersøkt

Navn på preparat	Leverandør
Svartsurbær	Plantchem
Svarthyllbær (økologiske)	Privat
Blåbær	Apotekproduksjon AS
Tranebær	Ocean Spray, USA
(friske)	
Søtlupin (NaProLup P56-H125)	Selvig AS, Horten
Bitterlupin	Purcell Mountain Farms, Idaho USA
Prikkperikum	Indigo Herbs of Glastonbury, UK
Legevendelrot	Indigo Herbs of Glastonbury, UK
Dvergpalme	Indigo Herbs of Glastonbury, UK
VitaePro®	VitaLab AS, Oslo
Lutein	Sigma-Aldrich
Zeaxanthin	Sigma-Aldrich
Astaxanthin	Chiron AS, Trondheim

For fullstendig oversikt over alle ekstraktene/fraksjonene til hvert enkelt preparat hvor AA ble målt, se vedlegg I.

Stamløsninger

Alle stamløsningene, ble laget av inndampet ekstrakt, flytende væske eller tørt stoff og løst i egnet løsemiddel. Konsentrasjonene til stamløsningene ble først og fremst basert på hvor mye stoff som var mulig å løse opp i en praktisk mengde med væske.

Utstyr og reagenser

Eppendorfrør, 2,0 ml

Renset vann (FI)

DMSO (Merck)

Metanol teknisk (Chemi-Teknikas)

Prosedyre

1. Uttak fra ekstraktene ble overført til eppendorfrør, og valgt løsemiddel ble tilsatt.
2. Alle løsningene ble mikset på whirlmikser til alt stoff var løst.
3. Løsningene ble oppbevart i kjøleskap 2-8 °C.

Prøveløsninger

Alle prøveløsningene besto av stamløsning og fosfatbuffer 50 mM inkludert 3 % BSA, i forholdet 20:80. Det ble gjennomgående laget 200 µl prøveløsning slik at de samme prøvene kunne analyseres i fire ulike forsøk. Konsentrasjonen til prøveløsningene ble bestemt av konsentrasjonen på stamløsningene, siden forholdet mellom stamløsning og fosfatbuffer, var lik i alle prøvene.

Utstyr og reagenser

Eppendorfrør, 1,5 ml

Fosfatbuffer 50 mM med BSA

Mellomløsninger med preparatene

Prosedyre

1. Det ble tatt ut 40 µl prøve fra stamløsningene/mellomløsningene, som ble overført til eppendorfrør, merket på forhånd.
2. Det ble tilsatt 160 µl fosfatbuffer 50 mM med BSA, og løsningene ble mikset i 15 sekunder på whirlmikser.
3. Alle prøveløsningene ble oppbevart i fryser -20 °C til de ble analysert.

3.3.10 Kontrollprøver

Hver analyse inneholdt både negative og positive kontrollprøver.

De negative kontrollene inneholdt de ulike løsemidlene brukt i prøvene hvor AA ble målt, fortynnet i fosfatbuffer. De positive kontrollprøvene inneholdt atropin i ulike konsentrasjoner, fortynnet i fosfatbuffer. Alle kontrollprøvene ble tilberedt i volumet 200 µl, og hadde samme forhold mellom fosfatbuffer 50 mM inkl. 3 % BSA og løsemiddel, som forholdet i prøveløsningene. Forholdet fosfatbuffer:prøve, eventuelt fosfatbuffer:løsemiddel, var alltid 80:20.

4. Resultat

4.1 Ekstraksjon av materiale til måling av antikolinerg aktivitet, AA

I denne oppgaven ble pulverisert materiale av svartsurbær, svarthyllbær, tranebær, søtlupin, bitterlupinbønner, prikkperikum, legevendelrot og dvergpalme ekstrahert. Videre ble ekstraktene undersøkt for potensiell AA. Alle preparatene nevnt ovenfor ble ekstrahert med diklormetan og 96 % etanol. Ekstrahering med 50 % etanol ble utført på søtlupin, bitterlupinbønner, prikkperikum, legevendelrot og dvergpalme. For fullstendig oversikt over hvilke ekstrakter/fraksjoner som ble analysert for hvert enkelt preparat, se vedlegg I.

Tørket og pulverisert materiale ble veid inn før ekstraksjon med diklormetan. Denne tørrstoffmengden ble utgangspunktet for utregningen av utbyttet fra hver ekstraksjon, se tabell 4.1. Ekstrahering av de fire bærpreparatene, ble utført i samarbeid med mastergradsstudent Maria Nguyen.

Tabell 4.1: Oversikt over utbytte fra ekstraksjoner av utvalgte naturpreparater og næringsmidler.

Preparat	Innveid mengde tørt materialet	Utbytter ved ekstraksjon med diklormetan	Utbytte ved ekstraksjon med 96 % etanol	Utbytte ved ekstraksjon med 50 % etanol
Svarthyllbær	60,0g	6,80 g	11,95 g	
		11,3 %	19,9 %	
Svartsurbær	90,0 g	1,77 g	41,85 g	

		1,9 %	46,5 %	
Blåbær	63,2 g	1,09 g	33,05 g	
		1,7 %	52,3 %	
Tranebær	30,0 g	0,92 g	26,49 g	
		3,1 %	41,9 %	
Søtlupin	99,7 g	7,47 g	0,84 g	6,08 g
		7,5 %	0,8 %	6,1 %
Bitterlupinbønner	96,3 g	10,02 g	4,25 g	9,55 g
		10,4 %	4,4 %	9,91 %
Prikkperikum	99,8 g	10,39 g	22,39 g	12,77 g
		10,4 %	22,4 %	Ikke bestemt
Legevendelrot	99,6 g	2,39 g	9,28 g	20,24 g
		2,4 %	9,3 %	20,3 %
Dvergpalme	99,0 g	13,76 g	9,13 g	5,52 g
		13,9 %	9,2 %	5,6 %

Bitterlupinbønner

Vannekstraktet fra bitterlupinbønner hvor det ble målt AA, var tilberedt etter bruksanvisning som fulgte med pakken med bønner ved kjøp. Denne metoden er nøye beskrevet under metoder og materialer, (avsnitt 3.2.4). Utbyttet av denne prosessen er satt opp i tabell 4.2.

Tabell 4.2: *Utbytte av bitterlupinbønner*

Preparat	Innveid mengde tørrstoff	Utbytte etter tilbereding
Bitterlupinbønner	97,06 g	5,72 g
		11,44 %

VitaePro[®]

Innholdet i en VitaePro[®] gelatinkapsel ble veid inn og løst i metanol slik at stamløsningen fikk en kjent konsentrasjon. En full kapsel og et tomt gelatinskall ble veid, slik at mengden som ble brukt i denne oppgaven ble regnet ut fra hva som er den virkelige mengden i en hel kapsel. På den måten ble det mulig å finne ut omtrentlig hvilken mengde av de tre deklarte innholdsstoffene lutein, zeaxantin og astaxantin som var i løsningen (tabell 4.3).

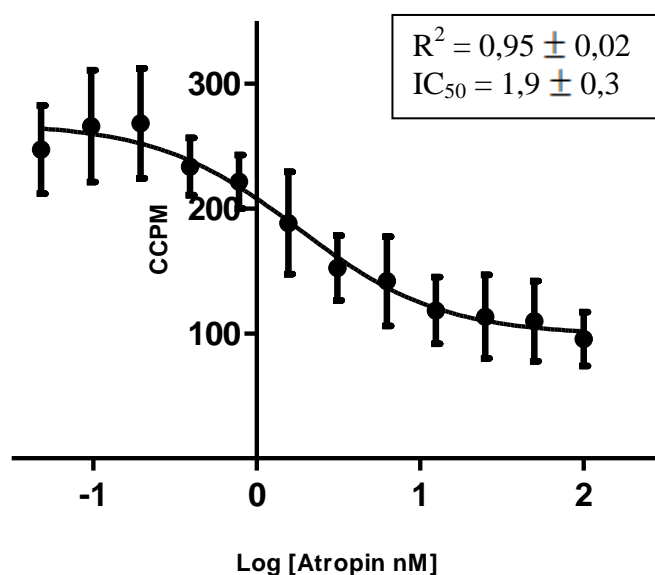
Tabell 4.3: *Innveid mengde VitaePro[®] og utregnet mengde lutein, zeaxanthin og astaxanthin*

Preparat	Innveid mengde VitaePro [®]	Utbytte i forhold til en full kapsel	Lutein	Zeaxantin	Astaxantin
VitaePro	95 mg	91 %	5,45 mg	1,09 mg	1,82 mg

4.2 Måling av antikolinerg aktivitet, AA, i utvalgte preparater

4.2.1 Standardkurve og validering

Det ble benyttet samme konsentrasjonsintervall på standardkurvene med atropin (0,05 – 100 nM), som det Jakobsen brukte i sin masteroppgave [53]. Dette konsentrasjonsområdet tilfredsstilte kravene til kompetitive bindingskurver, om en karakteristisk topp (total binding) og bunn (uspesifikk binding), figur 4.1.



Figur 4.1: Standardkurve med atropin fortynnet i fosfatbuffer 50 mM inkl. 3 % BSA ($n=9 \pm SD$)

Til fortynning av prøvene med atropin til standardkurven, ble det benyttet fosfatbuffer 50 mM inkludert 3 % BSA, istedenfor serum som var matriksen i den opprinnelige metoden [53, 60]. Dette er beskrevet i avsnitt 3.3.2, i metoder og materialer.

Resultatene viste at kurvene korrelerer bra med en kvadrert regresjonskoeffisient (R^2) lik 0,95 ($\pm 0,02$), og en gjennomsnittlig IC_{50} -verdi lik 1,9 ($\pm 0,3$). Den gjennomsnittlige verdien for uspesifikk binding (bunn), var 98,3 CCPM ($\pm 28,4$). For den totale bindingen (topp) av radioliganden, var tilsvarende verdier 268,4 CCPM ($\pm 31,3$). Til grunnlag for dette resultatet ligger ni ulike målinger med totalt 18 paralleller for hver konsentrasjon i hele kurven.

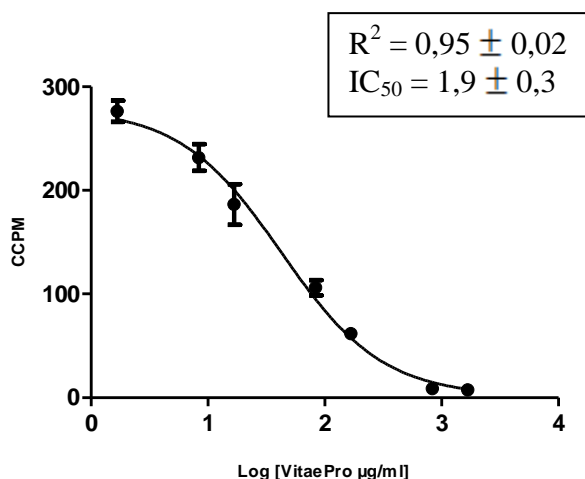
4.2.2 Kontrollprøver og presentasjon av resultater

For å sikre at løsemidlene som ble benyttet i prøveopparbeidelsen ikke påvirket målingen av AA, ble det i hver analyse målt AA i negative kontrollprøver (blanke prøver). Telletallene (CCPM) til prøvene som ble undersøkt for eventuell AA, ble sett på i forhold til CCPM hos de negative kontrollprøvene. De prøvene som var løst i DMSO ble justert i forhold til kontrollprøven med DMSO; prøver løst i MeOH ble justert i forhold til kontrollprøve med MeOH og prøver med H_2O i forhold til kontrollprøve med H_2O . På denne måten ble eventuell aktivitet i selve løsemidlet tatt hensyn til, og justert for. Den målte aktiviteten i hver enkelt prøve presenteres som prosentvis hemming av ligand (hemmingsgrad i %), i forhold til kontroll med samme løsemiddel. For å sikre at metoden fungerte optimalt, ble det benyttet en positiv kontroll med atropin i en konsentrasjon rundt i IC_{50} -verdi til atropin. Konsentrasjonene som oppgis i resultatene nedenfor, viser til forventede konsentrasjoner i inkubasjonsmiksturen.

4.2.3 VitaePro[®]

I et innledende pilotforsøk ble det analysert tre ulike konsentrasjoner av VitaePro[®] (data ikke illustrert). Alle tre konsentrasjonene viste høy grad av AA og en tydelig konsentrasjonsavhengighet. Den høyeste konsentrasjonen, 167 $\mu g/ml$, hadde en hemmingsgrad på 92 % ($\pm 0,8$). Tilsvarende tall for de to andre konsentrasjonene på 16,7

$\mu\text{g/ml}$ og $1,67 \mu\text{g/ml}$, var henholdsvis $85 \% (\pm 2,0)$ og $41 \% (\pm 8,0)$. Doseavhengig respons ble deretter bekreftet ved måling av AA i syv ulike konsentrasjoner i intervallet $1,67 - 1670 \mu\text{g/ml}$ (figur 4.2).



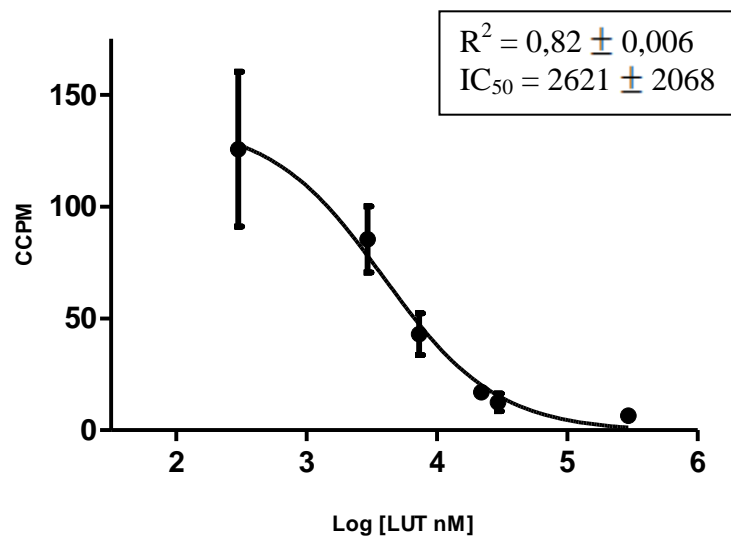
Figur 4.2: Konsentrasjonskurve VitaePro[®] ($n=3 \pm SD$)

Konsentrasjonskurven til VitaePro[®] (figur 4.2) viste en god kurvetilpasning, med en tydelig topp og bunn. Den kvadrerte regresjonskoeffisienten (R^2), ble lik $0,99 (\pm 0,003)$, og IC_{50} -verdien ble $42,7 \mu\text{g/ml} (\pm 5,7)$. En konsentrasjon på ca. $42,5 \mu\text{g/ml}$ må til for å fortrenge 50 % av den spesifikke liganden bundet til reseptorene *in vitro*.

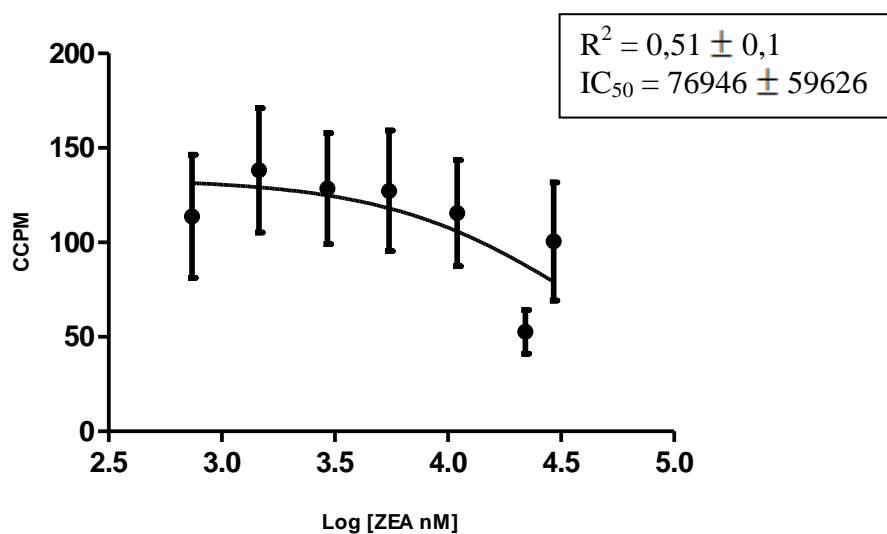
Produsenten av VitaePro[®], VitaeLab, har deklartert mengden til tre aktive innholdsstoffer i produktet. For å se om aktiviteten som ble målt i VitaePro[®] hadde en sammenheng med de tre innholdstoffene lutein, zeaxanthin eller astaxanthin, ble det målt AA i rent stoff av hver av dem.

4.2.4 Lutein, zeaxanthin og astaxanthin

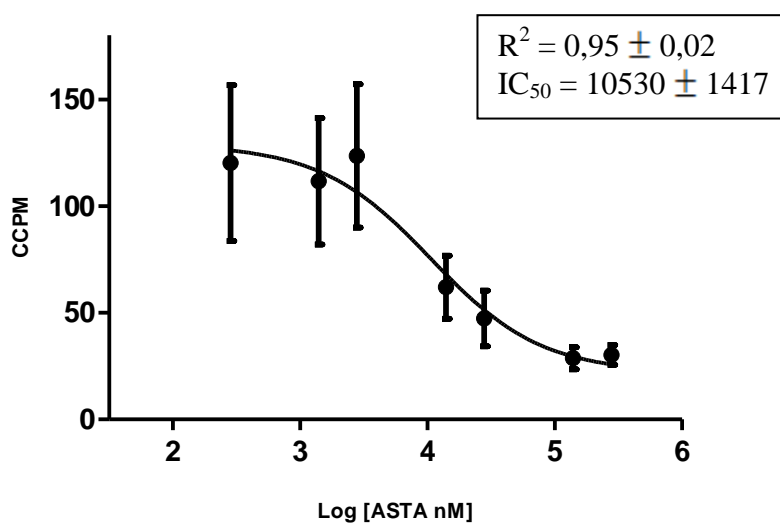
I likhet med VitaePro[®], ble det først målt AA i tre ulike konsentrasjoner, 167 µg/ml, 16,7 µg/ml og 1,67 µg/ml (data ikke vist). Det ble utvist høy grad av hemming hos alle tre forbindelsene. Videre ble konsentrasjonskurver med syv ulike konsentrasjoner analysert for å se om responsen var doseavhengig. Lutein og astaxanthin ble målt i konsentrasjonsintervallet (0,167 – 167 µg/ml), mens zeaxanthin ble målt i konsentrasjonsintervallet (0,416 – 16,7 µg/ml). Zeaxanthin ble undersøkt i et litt annet konsentrasjonsintervall på grunn av lite rent stoff tilgjengelig ved prøveopparbeidelsen.



Figur 4.3: Konsentrasjonskurven til Lutein ($n=3 \pm SD$)



Figur 4.4: Konsentrasjonskurven til zeaxantin ($n=3 \pm SD$)



Figur 4.5: Konsentrasjonskurven til astaxantin ($n=3 \pm SD$)

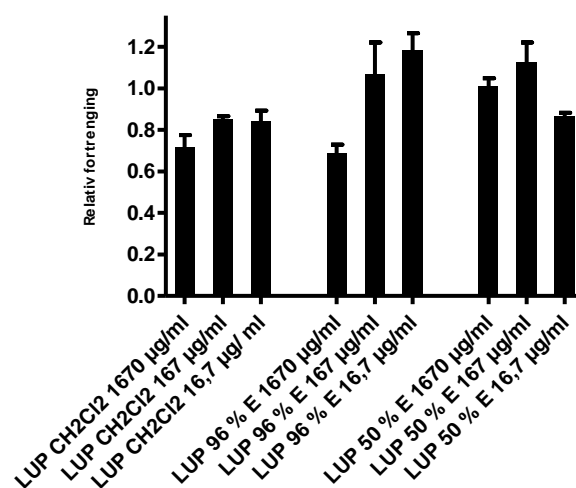
Konsentrasjonskurvene til lutein (figur 4.3) og astaxanthin (figur 4.5) viste henholdsvis middels og god korrelasjon, med gjennomsnittlige kvadrerte regresjonskoeffisienter, R^2 , på henholdsvis 0,82 og 0,95. Fortrengingen av den spesifikke liganden så ut til å være doseavhengig, både for lutein og for astaxanthin. Zeaxanthin (figur 4.4) viste en svakere

korrelasjon (figur 4.4). Hemmingsgraden som ble sett hos zeaxanthin så ikke ut til å være avhengig av konsentrasjon. Alle tre kurvene hadde til dels høye standardavvik. For lutein og astaxanthin gjaldt dette hovedsakelig de laveste konsentrasjonene, mens det for zeaxanthin var samme tendensen for alle konsentrasjonene.

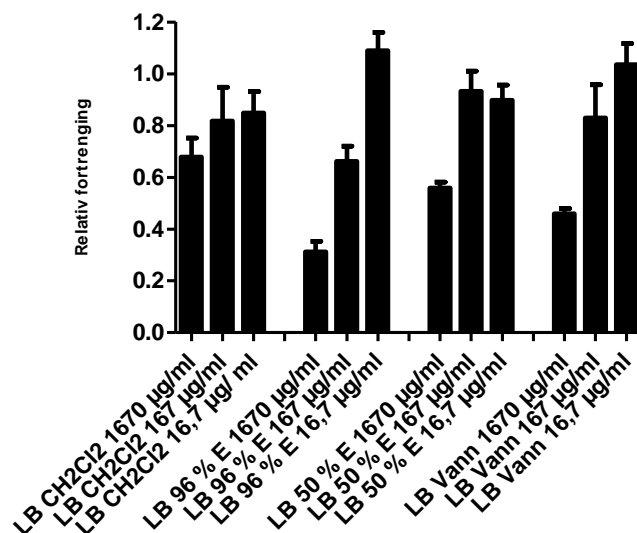
Konsentrasjonene til prøvene ble regnet om fra $\mu\text{g/ml}$ til nM , slik at verdiene kunne sammenlignes med tilsvarende verdi for atropin. Det var mulig å regne om til nM , på grunn av kjent molekylvekt til de tre renstoffene. Som nevnt tidligere ble den gjennomsnittlige IC_{50} -verdien for atropin $1,9 \text{ nM}$ ($\pm 0,3$). IC_{50} -verdien til lutein og astaxanthin var henholdsvis 2621 nM ± 2068 og 10530 nM ± 1417 . Verdiene er omtrent 1300 og 5500 ganger høyere, enn tilsvarende verdi for atropin.

4.2.5 Søtlupin og bitterlupinbønner

Det ble undersøkt AA i tre ulike konsentrasjoner ($1670 \mu\text{g/ml}$, $167 \mu\text{g/ml}$ og $16,7 \mu\text{g/ml}$) fra hvert ekstrakt av søtlupin (figur 4.6) og bitterlupinbønner (figur 4.7).



Figur 4.6: Stolpediagram som viser grad av hemming hos søtlupin hvor det er korrigert for grad av hemming i negativ kontroll med tilsvarende løsemiddel. Stolper lavere enn 1.0 utviser hemming.



Figur 4.7: Stolpediagram som viser grad av hemming hos bitterlupinbønner hvor det er korrigert for hemming i negativ kontroll med hvert enkelt løsemiddel. Stolper lavere enn 1.0 utviser hemming.

I ekstraktene fra søtlupin var det noe tegn til AA i prøvene fra diklormetaneekstraktet. Prøven ”LUP CH₂Cl₂ 1670 µg/ml” hadde størst grad av hemming med en fortrenging av ligand på 39 % ($\pm 6,0$). Tegn til aktivitet ble også vist i prøvene ”LUP 96 % E 1670 µg/ml” og ”LUP 50 % E 16,7 µg/ml”. Her ble hemmingsgraden på henholdsvis 33 % ($\pm 4,0$) og 24 % ($\pm 2,0$), men aktiviteten så ikke ut til å være avhengig av dose i noen av ekstraktene. Omtrentlig IC₅₀-verdi kunne ikke bestemmes i noen av ekstraktene fra søtlupin siden hemmingsgraden ikke var høy nok i noen av tilfellene.

Som figur 4.7 viser, ble det i bitterlupinekstraktene sett tegn til AA i alle prøvene unntatt ”LB 96 % E 16,7 µg/ml” og ”LB Vann 16,7 µg/ml”. Både 96 % etanolekstraktet og vannekstraktet ga en hemming som så ut til å være doseavhengig. Dette var ikke like tydelig i diklormetaneekstraktet og 50 % etanolekstraktet. Prøvene fra diklormetaneekstraktet ga for lite hemming av ligand til at det var mulig å anta IC₅₀-verdi. I de andre bitterlupinekstraktene (se figur 4.7), var det mulig å finne en omtrentlig IC₅₀-verdi, men en nøyaktig konsentrasjon kan ikke presenteres. For 96 % etanolekstraktet og vannekstraktet, ligger IC₅₀-verdien i

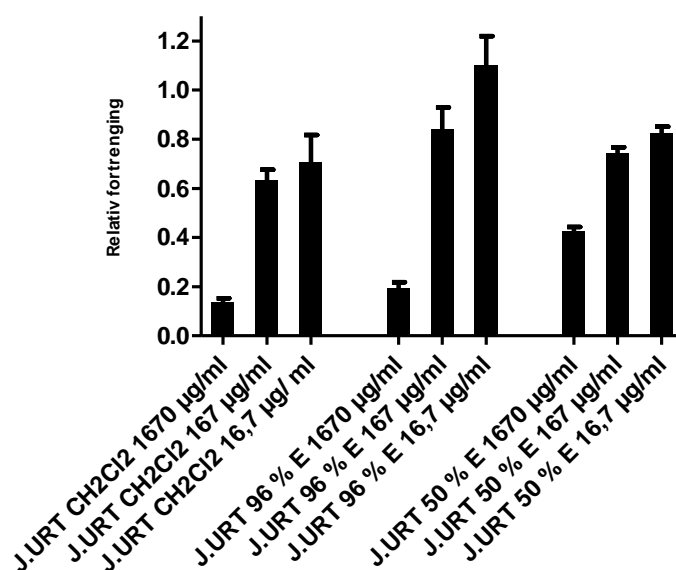
konsentrasjonsområdet 167 – 1670 µg/ml, mens verdien til 50 % etanolekstraktet ligger i området rundt 1670 µg/ml.

4.2.6 Prikkperikum, legevendelrot og dvergpalme

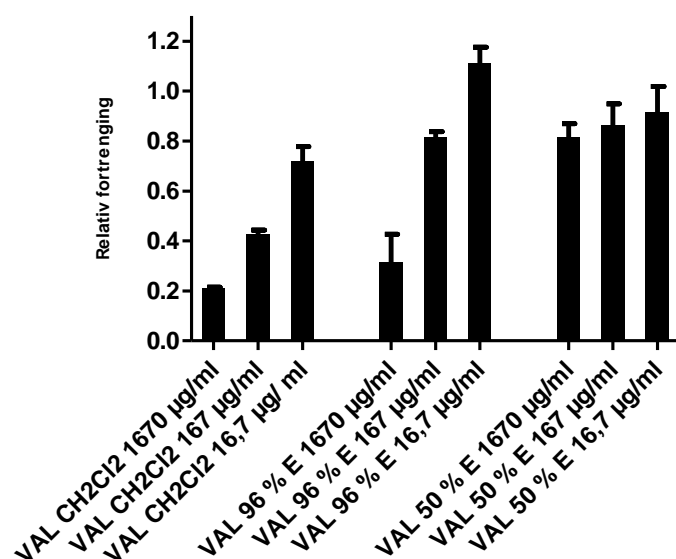
I ekstraktene fra prikkperikum (figur 4.8) viste alle prøvene, unntatt ”J.URT 96 % E 16,7 mg/ml”, tegn til AA. Det så ut til at aktiviteten i alle tre ekstraktene med diklormetan, 96 % etanol og 50 % etanol, var doseavhengig.

I legevendelrot (figur 4.9) ble det utvist AA i prøvene fra diklormetanekestektet og i 96 % etanolekstraktet, og grad av hemming så ut til å være avhengig av dose i begge ekstraktene. I ekstraktet med 50 % etanol var det ikke like stor grad av hemming, og det var ikke en tydelig doseavhengig respons. % -vis hemmingsgrad til alle konsentrasjonene fra hver av ekstraktene, er satt opp i tabell 4.4.

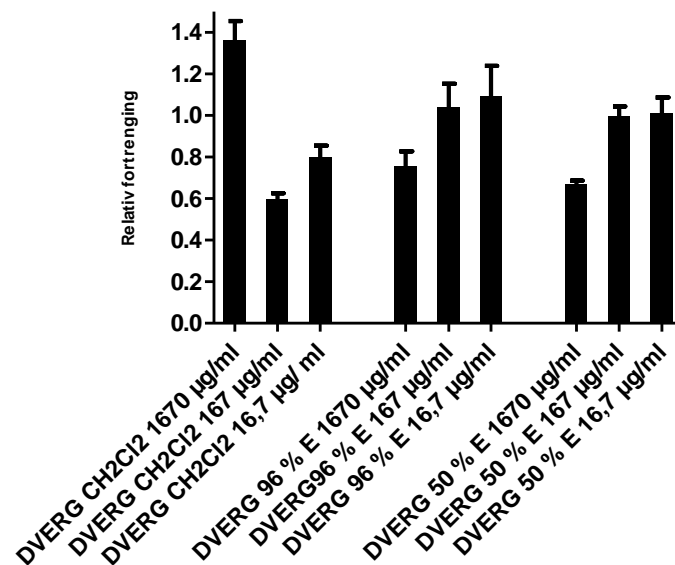
Omtrentlig IC₅₀-verdi for ekstraktene fra prikkperikum (figur 4.8) ligger i konsentrasjonsområdet 167-1670 µg/ml. Tilsvarende verdi for diklormetanekestektet og 96 % etanolekstraktet fra legevendelrot (figur 4.9), lå henholdsvis i konsentrasjonsområdet 16,7-167 µg/ml og 167-1670 µg/ml.



Figur 4.8: %-vis hemming i ekstraktene fra prikkperikum, hvor det er korrigert for hemming i negativ kontroll for hvert enkelt løsemiddel. Stolper lavere enn 1.0 utviser hemming.



Figur 4.9: %-vis hemming i ekstraktene fra legevendelrot, hvor det er korrigert for hemming i negativ kontroll for hvert enkelt løsemiddel. Stolper lavere enn 1.0 utviser hemming.



Figur 4.10: % -vis hemming i ekstraktene fra dvergpalme, hvor det er korrigert for hemming i negativ kontroll for hvert enkelt løsemiddel. Stolper lavere enn 1.0 utviser hemming.

I ekstraktene fra dvergpalme var hemmingsgraden mindre tydelig, og det var vanskelig å se om responsen var avhengig av konsentrasjon (figur 4.10). De prøvene fra diklormetaneekstraktet med lavest konsentrasjon, viste tydelig grad av hemming, men den høyeste konsentrasjonen ga ingen fortrenging av ligand i det hele tatt. Av den grunn ble det ikke mulig å si om denne responsen var konsentrasjonsavhengig. % -vis hemmingsgrad for de ulike ekstraktene fra dvergpalme, er oppført sammen med resultatene for prikkperikum og legevendelrot (tabell 4.4). Generelt lave standardavvik.

Tabell 4.4: Hemmingsgrad i %, av prøver fra prikkperikum, legevendelrot og dvergpalme. Alle navn på prøver er forklart i vedlegg 1.

Ekstrakt	Prikkperikum	Legevendelrot	Dvergpalme
CH ₂ Cl ₂ 1670 µg/ml	87 % ± 2,0	79 % ± 0,4	-36 % ± 9,0
CH ₂ Cl ₂ 167 µg/ml	37 % ± 4,0	68 % ± 2,0	41 % ± 3,0
CH ₂ Cl ₂ 16,7 µg/ml	30 % ± 11	28 % ± 6,0	20 % ± 5,0
96 % E 1670 µg/ml	81 % ± 3,0	69 % ± 11	25 % ± 7,0
96 % E 167 µg/ml	16 % ± 9,0	19 % ± 2,0	-4,0 % ± 11
96 % E 16,7 µg/ml	-10 % ± 12	-11 % ± 6,0	-9,0 % ± 14
50 % E 1670 µg/ml	68 % ± 2,0	19 % ± 5,0	34 % ± 2,0
50 % E 167 µg/ml	26 % ± 2,0	14 % ± 8,0	1,0 % ± 5,0
50 % E 16,7 µg/ml	18 % ± 3,0	7,0 % ± 10	-1,0 % ± 7,0

4.2.7 Bær med antioksiderende egenskaper

En oversikt over alle ekstraktene og fraksjonene fra svartsurbær, svarthyllbær, blåbær og tranebær hvor AA ble undersøkt, er presentert i tabell 4.5. Mange ekstrakter/fraksjoner gjorde at AA ble undersøkt i kun én konsentrasjon fra hvert ekstrakt/fraksjon i første måling. Den første målingen fungerte som en skanning slik at prøver der det ble vist tegn til aktivitet,

ble undersøkt for potensiell AA i flere ulike konsentrasjoner for å se om responsen var konsentrasjonsavhengig.

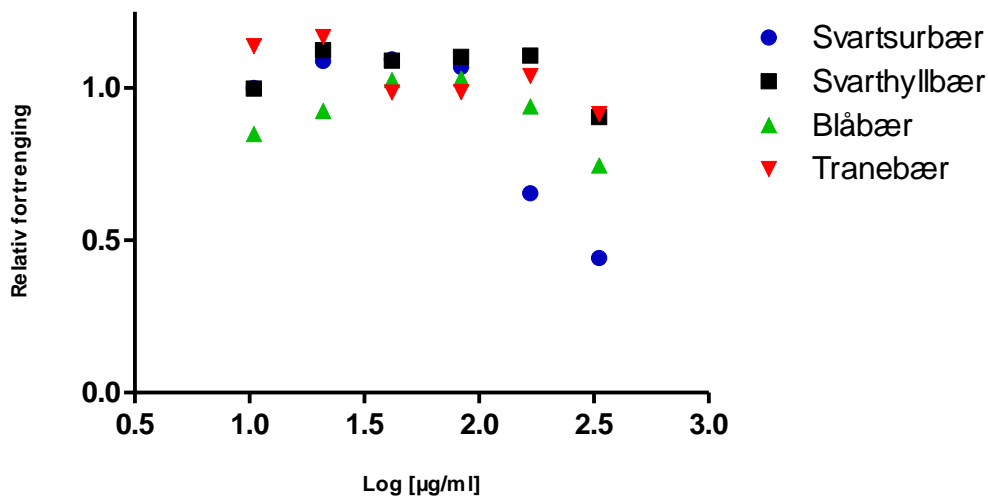
Eventuelle løselighetsproblemer ble prøvd unngått ved å benytte to ulike løsemidler for diklormetaneekstraktene, 96 % etanolekstraktene og 50 % etanolekstraktene. Ekstraktene ble løst og analysert med henholdsvis DMSO/MeOH og MeOH/vann. Vannektene ble løst bare i vann, mens metanolekstraktet ble løst metanol fordi det i disse tilfellene ikke var grunn til å tvile på løseligheten. For noen av ekstraktene, kunne det se ut til at valgt løsemiddel hadde noe å si for resultatet, men ingen av løsemidlene som utmerket seg spesielt som generelt dårligere for alle ekstraktene som ble undersøkt (tabell 4.5).

De fleste prøvene i skanningen viste liten, eller ingen grad av hemming. Standardavvikene varierte, men var generelt høye. Svartsurbær var det bærmaterialet hvor tydelig hemming ble vist i flere ulike ekstrakter/fraksjoner. Prøvene "ARO 50 % E i H₂O" og "ARO 50 % E Lav i MeOH" (forkortelser forklart i vedlegg I) viste størst aktivitet, med en hemmingsgrad på henholdsvis 24 % ($\pm 5,0$) og 39 % ($\pm 8,0$).

Fraksjonen "50 % E Lav i MeOH" (forkortelse forklart i vedlegg I), var den eneste fraksjonen hvor alle bærpreparatene viste tegn til hemming av ligand. Svartsurbær, svarthyllbær, blåbær og tranebær hadde en hemmingsgrad på henholdsvis 39 % ($\pm 8,0$), 15 % (± 17), 11 % (± 16) og 8,0 % (± 12). For alle fire bærpreparatene ble AA undersøkt i seks ulike konsentrasjoner i intervallet 10,4 – 333 µg/ml, fra denne fraksjonen. Svarthyllbær, blåbær og tranebær utviste liten forskjell i hemmingsgrad mellom de ulike konsentrasjonene (figur 4.11). I fraksjonen fra svartsurbær ble det sett tydelig tegn til hemming i de to høyeste konsentrasjonene, 167 µg/ml og 333 µg/ml. Hemmingsgraden var henholdsvis 35 % ($\pm 5,0$) og 66 % ($\pm 2,0$), men ut i fra dette forsøket, var det vanskelig å si noe om denne hemmingen kunne være konsentrasjonsavhengig.

Tabell 4.5: % -vis grad av hemming hos svartsurbær, svarthyllbær, blåbær og tranebær. Konsentrasjonene i inkubasjonsmiksturen var 16,7 µg/ml for diklormetaneekstraktene og 167 µg/ml for de andre ekstraktene/fraksjonene. Navn på prøver er forklart i vedlegg I.

Ekstrakt/ fraksjon	Svartsurbær	Svarthyllbær	Blåbær	Tranebær
CH ₂ Cl ₂ i DMSO	16 % +/- 15	7,0 % +/- 15	-11 % +/- 18	-12 % +/- 22
CH ₂ Cl ₂ i MeOH	-14 % +/- 15	18 % +/- 12	-39 % +/- 15	-45 % +/- 16
96 % E i MeOH	-13 % +/- 17	-18 % +/- 16	-27 % +/- 20	-36 % +/- 17
96 % E i H ₂ O	5,0 % +/- 9,0	3,0 % +/- 1,0	- 13 % +/- 7,0	-16 % +/- 9,0
50 % E i MeOH	4,0 % +/- 13	-2,0 % +/- 0,18	5,0 % +/- 14	-19 % +/- 22
50 % E i H ₂ O	24 % +/- 5,0	13 % +/- 3,0	11 % +/- 7,0	-6,0 % +/- 18
50 % E Lav i MeOH	39 % +/- 8,0	15 % +/- 17	11 % +/- 16	8,0 % +/- 12
50 % E Høy i H ₂ O	20 % +/- 6,0	2,0 % +/- 2,0	4,0 % +/- 4,0	-11 % +/- 12
100° C i H ₂ O	-8,0 % +/- 5,0	-7,0 % +/- 8,0	-30 % +/- 14	-37 % +/- 22
50° C i H ₂ O	5,0 % +/- 15	5,0 % +/- 10	10 % +/- 14	-3,0 % +/- 11

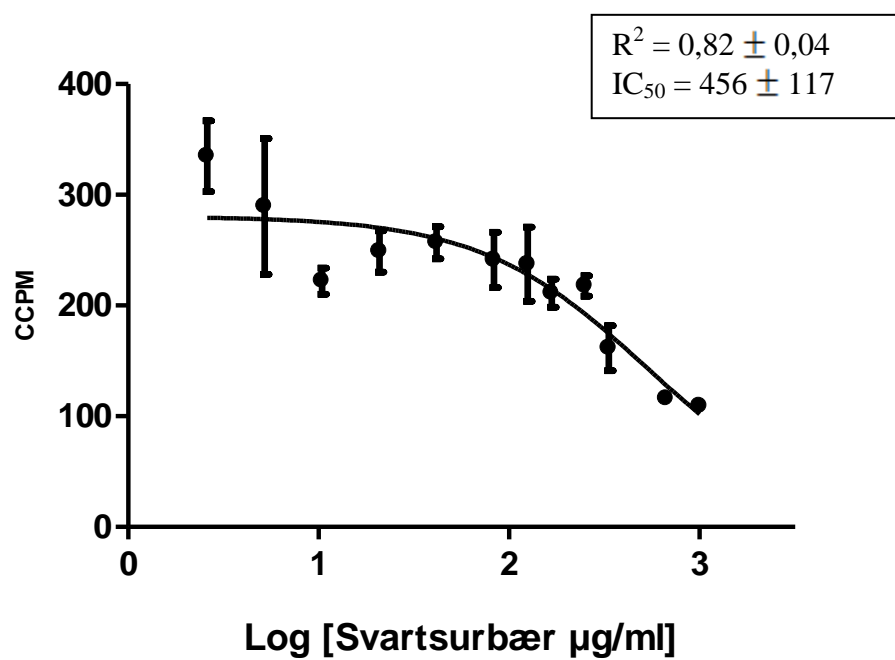


Figur 4.11: %-vis hemmingsgrad hos de fire bærene i den utvalgte fraksjonen

Svartsurbær

For å undersøke om hemmingen hos den utvalgte fraksjonen fra svartsurbær kunne være konsentrasjonsavhengig, ble det analysert 12 ulike konsentrasjoner i intervallet 2,6-333 µg/ml (figur 4.12). De høyeste konsentrasjonene utviste høy hemmingsgrad, hvor 63 % ($\pm 4,0$) var høyeste grad av fortregning. Konsentrasjonen 2,6 µg/ml var den eneste prøven som ikke viste tegn til hemming ($-1,13\%$ (± 14)).

De fleste konsentrasjonene fra svartsurbær viste tegn til AA, men kurvetilpassingen til kompetitive bindingskurver ble mindre god, med en kvadrert regresjonskoeffisient (R^2), lik 0,82 ($\pm 0,04$). Standardavvikene var gjennomgående lave for hele konsentrasjonskurven, men litt større for konsentrasjonene, 2,6 µg/ml og 5,2 µg/ml (figur 4.12). IC_{50} -verdien for denne fraksjonen fra svartsurbær ble estimert til 456 µg/ml (± 117).



Figur 4.12: Konsentrasjonskurve for svartsurbær, fraksjon; ARO 50 % E Lav i MeOH (forkortelse forklart i vedlegg I)

5. Diskusjon

I denne oppgaven ble det kartlagt antikolinerg aktivitet, AA, i utvalgte naturpreparater og næringsmidler. Hos eldre er AA i serum assosiert med *delir* og demens [7, 11]. Av den grunn ble det lagt vekt på preparater som er spesielt aktuelle for denne gruppen i befolkningen. En kartlegging av mulig AA i naturpreparater og næringsmidler kan være viktig, selv om vanlig bruk ikke er forbundet med antikolinerge bivirkninger. Hos pasienter med legemiddelbehandlinger hvor det inngår legemidler som utøver AA, kan det være lite som skal til for å gi reduserte kognitive funksjoner. Inntak av naturpreparater eller næringsmidler med potensielle antikolinerge egenskaper kan da være utløsende faktor for at antikolinerge bivirkninger oppstår.

Næringsmidler

Bakgrunnen for å teste søtlupin og bitterlupin var rapporterte tilfeller etter inntak av bitterlupin [12-14]. Resultatene i denne oppgaven viste en tydelig forskjell i målt AA mellom ekstraktene fra søtlupin og bitterlupinbønner. Ingen av ekstraktene fra søtlupin viste tydelig tegn til hemming av ligand. Dette funnet er i tråd med tidligere dokumentasjon på søtlupin om at produktet ikke skal inneholde toksiske forbindelser [47, 51]. Hos bitterlupinbønnene ble det målt en tydelig hemmingsgrad både i 96 % etanolekstraktet og i vannekstraktet. Grad av hemming så ut til å være lik i begge ekstraktene, og ut i fra resultatene presenterte i figur 4.7, så hemmingsgraden ut til å være konsentrasjonsavhengig. Målt AA i vannekstraktet støtter den generelle oppfatningen om at bitterlupinbønner må tilberedes nøyaktig etter bruksanvisning (metode 3.2.4), før de trygt kan benyttes som næringsmiddel.

Studier har vist at lupintoksisiteten skyldes det høye innholdet av alkaloider [13, 50]. Det er stor mulighet for at begge ekstraktene som viste konsentrasjonsavhengig AA, inneholdt alkaloider. Spartein (figur 1.7) og lupanin (figur 1.8) er identifisert som to av de mest toksiske alkaloidene i lupin [49]. Den aktiviteten som ble målt i ekstraktene fra bitterlupinbønnene i denne oppgaven, kan derfor muligens komme fra disse alkaloidene. Tidligere studier av lupin støtter denne teorien [49, 50], men før det blir gjort nærmere identifisering av innholdsstoffene i ekstraktene som utviste AA, kan ingen konklusjoner trekkes. Ved å se på strukturen til spartein og lupanin, er det ikke utenkelig at de kan fungere som muskarinerge antagonister. Begge inneholder karbonskjeletter med tertiære aminer [49] og ligner strukturmessig både på ACh (figur 1.1) og atropin (figur 1.2). Spartein og lupanin er i utgangspunktet upolare molekyler, og hvis molekylene ikke var ladet under ekstraksjonsbetingelsene, er det stor sannsynlighet for at de ble ekstrahert ut med diklormetan og 96 % etanol. Det kan være at 50 % etanol ble for polart til å kunne ekstrahere ut spartein og lupanin i stor grad, og at det av den grunn ikke ble sett særlig grad av aktivitet i dette ekstraktet. En forklaring på mindre hemmingsgrad i 50 % etanolekstraktet, kan være at de fleste aktive forbindelsene ble ekstrahert ut med 96 % etanol, slik at det ikke var noen aktive forbindelser igjen i restmaterialet da 50 % etanolekstraksjonen ble utført.

Den høye aktiviteten som ble sett i vannekstraktet støtter ikke teorien om at 50 % etanol var for polart til å kunne ekstrahere ut de aktive forbindelsene. Vannekstraktet ble opparbeidet med en annen metode (metode 3.2.4) enn de andre ekstraktene. Oppvarmingen og kokingen av vannekstraktet, kunne kanskje bidra til at betingelsene for ekstraheringen endret seg litt, slik at forbindelser som ikke ble ekstrahert ut med 50 % etanol, likevel kunne trekkes ut i vann. Siden pH ikke ble målt eller justert i noen av tilfellene, kan også ulik pH være forklaringen på ulikhetene i resultatene.

I og med at alkaloider kan være både basiske, sure og nøytrale [20], kan det være at ekstraksjonsutbyttet hadde blitt større ved å endre på pH-verdien. Men siden innholdet og forbindelsene i de fleste ekstraktene var ukjent, kunne en endring av pH ført til ødeleggelse av opprinnelige forbindelser. Ukjente forbindelser i ekstraktene kunne blant annet ha blitt hydrolysert ved endring av pH-verdien, og gjort en eventuell identifisering mer komplisert.

Det er beskrevet to episoder hvor pasienter fikk antikolinerge symptomer etter å ha inntatt bakst hvor søtlupinmel var blitt brukt [12, 13]. Begge tilfellene ble rapportert i Australia, hvor det dyrkes store mengder søtlupin som brukes i melproduksjon. Dette melet har strenge krav og kontroller av mengde alkaloider. I søtlupin som ble analysert i denne oppgaven, fulgte det med en produktdeklarasjon fra produsenten hvor det dokumenteres at innhold alkaloider er $\gg 50$ ppm [61]. I og med at lupintoksisiteten er satt i forbindelse med innhold av alkaloider [49, 50], er det naturlig å tro at dette var årsaken til de antikolinerge symptomene til pasientene i Australia. Det kan være mulig at viltvoksende bitterlupin hadde forplantet seg med, og kontaminert søtlupin under dyrking, slik at melet som ble brukt, hadde et høyere innhold av alkaloider enn det kravene tillater [47]. I litteraturen er det også beskrevet flere tilfeller hvor pasienter er blitt innlagt med antikolinerge symptomer etter inntak av bitterlupinbønner tilberedningen har vært ufullstendig [13]. Resultatene i denne oppgaven samsvarer med tidligere dokumentasjon på at bitterlupinbønner ser ut til å inneha antikolinerge egenskaper, mens søtlupin ikke ser ut til å ha de samme egenskapene. I tillegg viser de rapporterte tilfellene [13], at de antikolinerge egenskapene sannsynligvis har en sammenheng med innholdet av alkaloider i de produktene som ble benyttet som næringsmiddel.

De rapporterte tilfellene om antikolinerge symptomer etter inntak av bitterlupinbønner, bekrefter at forbindelsene som ga disse symptomene kan passere BHB og utøve effekt i CNS. Det er trolig at alkaloidene nevnt ovenfor kan passere BHB, men det er ikke dokumentert hvorvidt det var alkaloidene som ga de antikolinerge symptomene hos pasientene. Hvilke konsentrasjoner serum må ha for at AA skal være av betydning er ikke klarlagt, men de rapporterte tilfellene viser at det er mulig å innta mengder som kan gi kliniske symptomer på AA. Personer som er særlig utsatte for påvirkning av AA, bør derfor være oppmerksomme på at bitterlupinbønner innehar potensielle antikolinerge egenskaper.

Beroligende og søvnfremmende midler

Bivirkninger ved bruk av prikkperikumpreparater er rapportert å være blant annet gastrointestinale symptomer, svimmelhet, forvirring og tretthet [20]. Noen av disse bivirkningene kan muligens settes i forbindelse med funnene fra målingen av AA i prikkperikum i denne oppgaven. Det ble sett en tydelig konsentrasjonsavhengig AA både i det lipofile ekstraktet, og i de mer hydrofile etanolekstraktene. Dette kan være forklaringen til at forvirring er rapportert som en bivirkning etter inntak av prikkperikumpreparater.

Hypericin og hyperforin, henholdsvis et naftodianthron og et prenylert floroglucinol, antas å utøve den primære antidepressive effekten av prikkperikum [20, 36]. Det er store molekyler som består av karbonskjeletter og lange karbonkjeder. Begge molekylene inneholder flere ketoner [20]. Strukturmessig er de derfor svært ulike ACh og atropin, og det er lite sannsynlig at de kan fungere som muskarinerge antagonister. Det kan likevel ikke utelukkes at ketonene kan ha evne til å binde seg til de muskarinerge reseptorene, slik at det skjer en hemming av ligand. Metoden som blir brukt til målingen av AA i denne oppgaven gir ingen informasjon om hvilke bindinger som finner sted i inkubasjonsmiksturen.

Prikkperikum inneholder også lavmolekylære flavonoider med antioksiderende egenskaper [20]. Flavonoidene vil kunne ekstraheres ut i begge etanolekstraktene. De antikolinerge egenskapene som ble sett i etanolekstraktene, kan muligens skyldes flavonoidene. De kjemiske egenskapene til hypericin og hyperforin gjør at de også kan ekstraheres ut i etanolekstraktene. Etanol er i tidligere studier bekreftet å være det beste ekstraksjonsmidlet for å få ekstrakter med disse forbindelsene. Hyperforin er svært ustabilt og derfor lite trolig tilstede i ekstraktene i denne studie, da AA ble målt. Hypericin degraderes også i betydelig grad forholdsvis raskt, men kunne tenkes å være tilstede i ekstraktene da de ble undersøkt for potensielle antikolinerge egenskaper [36].

Hos legevendelrot ble det sett en tydelig konsentrasjonsavhengig AA i prøvene fra diklormetaneekstraktet og 96 % etanolekstraktet. 50 % etanolekstraktet viste en liten hemmingsgrad, men det var ikke store forskjeller mellom de ulike konsentrasjonene. Det er trolig at de flyktige oljene i legevendelrot ble ekstrahert ut med diklormetan, og det kan være noen av disse som står for aktiviteten som ble målt i dette ekstraktet [20].

Alkaloidene valerianin (figur 1.6) og valerian (figur 1.6), som er identifisert i legevendelrot [20], ble trolig ekstrahert ut med enten diklormetan eller 96 % etanol. Det er også mulig at forbindelsene kunne være tilstede i begge ekstraktene. Begge alkaloidene inneholder et tertiært amin som sitter i et karbonskjelett. Det tertiære aminet gjør at de kjemiske egenskapene kan ligne på egenskapene til ACh og atropin [62]. Av den grunn er det mulig at de kan fungere som muskarinerge antagonist. Hvis alkaloidene er årsaken til at det ble sett AA i diklormetanelekstraktet og i 96 % etanolekstraktet, måtte de her foreligge på nøytral form for å kunne bli ekstrahert ut. Valerianin er så upolart at det nesten uansett pH-verdi, mest sannsynlig ville blitt ekstrahert ut i de lipofile løsemidlene, mens valerian i ladet tilstand kanskje kunne blitt ekstrahert ut i et mer polart løsemiddel. Det ble trolig ikke ekstrahert ut verken valerianin eller valerian med 50 % etanol, og det kan være forklaringen på hvorfor det ikke ble sett like høy grad av hemming i dette ekstraktet. Men siden ingen av innholdsstoffene i ekstraktene fra legevendelrot er identifisert, er det for tidlig å kunne si konkret hvilke forbindelser som utøvde AA.

Det er ikke funnet verdier for hva serumkonsentrasjonen blir etter inntak av prikkperikum eller legevendelrot, men den døgndosen som inntas er på henholdsvis 425 og 200 mg tørket ekstrakt [63, 64]. Med tanke på at mange inntar disse preparatene, er det lite trolig at en døgndose kan gi serumkonsentrasjoner som fører til antikolinerge symptomer. For de fleste som inntar prikkperikum og legevendelrot i anbefalte doser, vil ikke funnene i denne oppgaven være av stor praktisk betydning. Det kan likevel ikke utelukkes at aktiviteten som ble vist i noen av ekstraktene, kan være relevant i enkelte situasjoner. Hos eldre som har en legemiddelbehandling hvor det inngår stoffer med potensiell AA, kan kanskje et inntak av prikkperikum eller legevendelrot være det som skal til for at antikolinerge bivirkninger oppstår.

Middel mot benign prostata hyperplasi

I ekstraktene fra dvergpalme ble det sett tegn til AA i to av konsentrasjonene med diklormetan, men siden den høyeste konsentrasjonen ikke ga noen hemming, var det vanskelig å si om aktiviteten i ekstraktet var konsentrasjonsavhengig eller ikke. En mulig forklaring er at prøven med den høyeste konsentrasjonen kan ha vært for dårlig oppløst i det

80

valgte løsemidlet. Det lipofile ekstraktet ble svært seigt, og så ut til å inneholde store mengder med fettløselige forbindelser. Polariteten til DMSO som ble benyttet som løsemiddel i denne prøven, var muligens litt for høy, slik at noe forble uløst selv om det ved øyesyn så ut til at alt var oppløst.

I dvergpalme er det funnet fytosteroler, blant annet β -sitosterol, som trolig ble ekstrahert ut med diklormetan. Fytosteroler er lipofile og kan ha evnen til å passere BHB, men strukturmessig er de veldig forskjellige fra ACh og atropin (mangler tertiært amin og ester) [20]. Det er derfor lite trolig at de kan inneha de samme egenskapene som muskarinerge antagonister, og blokkere reseptorer i CNS, men det er mulig at de kan interagere med reseptorene slik at den spesifikke liganden ble forhindret i å binde seg. Flavonoider er også identifisert i dvergpalme. Disse kan muligens ha blitt ekstrahert ut i både diklormetaneekstraktet og etanolekstraktene, og være forklaringen til den aktiviteten som ble sett i diklormetaneekstraktet [20]. I de hydrofile ekstraktene ble det ikke sett tegn til hemming.

Preparater med antioksiderende egenskaper

Kosttilskuddet VitaePro[®] var det preparatet som viste best kurvetilpasning med tydelig grad av hemming i alle konsentrasjonene som ble analysert. VitaePro[®] inneholder de tre antioksidantene lutein, zeaxanthin og astaxanthin [32]. De tre rensubstansene ble analysert hver for seg, for å se om noen av disse ga en tilsvarende hemming til det VitaePro[®] viste, eller om aktiviteten eventuelt ble utøvd av hjelpestoffene i kapslene. Av de tre stoffene, viste astaxanthin høy grad av hemming med den beste kurvetilpasningen. Lutein og zeaxanthin viste også høy hemmingsgrad i de høyeste konsentrasjonene, men disse hadde en dårligere kurvetilpasning. Funnene fra målingen av AA i de tre rensubstansene, gir grunn til å anta at den høye graden av aktivitet som ble sett hos VitaePro[®], hovedsakelig skyldtes tilstedeværelsen av astaxanthin.

Strukturformelen til astaxanthin (figur 1.4) viser en lang kjede med umettede karbonatomer, med en karbonring med syregruppe og metylgrupper i hver ende av kjeden. Molekylet er i høy grad lipofilt, og derfor fungerte metanol godt som løsemiddel til prøvene. Hvorfor molekylet gir en høy hemmingsgrad er vanskelig å si. Sammenlignet med ACh og atropin er det strukturelt sett veldig forskjellig, og astaxanthin mangler det tertiære aminet som ser ut til å ha stor betydning for bindingen til de muskarinerge reseptorene. Det kan tenkes at syregruppene på de to ringene i hver ende av karbonkjeden, har noe å si for evnen molekylet har til å binde seg til reseptorene. Aktiviteten som ble utvist kan eventuelt forklares med høye konsentrasjoner av stoff i prøvene, slik at den spesifikke liganden ble fysisk forhindret i å binde seg til reseptorene, uten at molekylet i seg selv utøvde noen virkelig AA. Denne metoden for måling av AA har ikke mulighet til å si hva som faktisk gir fortrenning av ligand [60].

Ved å se på molekylet til astaxanthin (figur 1.4), er teorien om fysisk forhindring mest sannsynlig, men samtidig må det tas hensyn til at resultatene viste en tydelig sammenheng mellom hemmingsgrad og konsentrasjon. Det er mindre sikkert om en fysisk blokkering av liganden vil kunne være konsentrasjonsavhengig og gi reproducerbare data. Det ble sett litt høye standardavvik i analyseringen av lutein, astaxanthin og zeaxanthin, men dette var ikke tilfellet ved målingen av AA i VitaePro[®]. Den høye korrelasjonen vist i konsentrasjonskurven til VitaePro[®], taler imot at hemmingen som ble sett, skyldes svært høye konsentrasjoner av preparatet i inkubasjonsmiksturen.

Det er ikke kjent hvilke serumkonsentrasjoner som oppnås ved inntak av VitaePro[®], men det er sannsynlig at det må inntas store mengder av innholdet, for å oppnå samme konsentrasjon i serum, som de konsentrasjonene hvor AA ble målt i denne oppgaven. Hvilke serumkonsentrasjoner som må til for at inntak av VitaePro[®] skal få kliniske betydninger er ukjent, og det er ikke blitt rapportert om antikolinerge bivirkninger knyttet til inntak av VitaePro[®] per dags dato. Uansett er det tydelig at innholdsstoffene i VitaePro[®], og da særlig astaxanthin, har potensielle antikolinerge egenskaper. Hvorvidt de aktive forbindelsene har evne til å passere BHB er ennå ikke kjent, og det er derfor for tidlig å si hvilke kliniske betydninger funnene i studien kan ha.

Mørke bær som blåbær, svartsurbær og svarthyllbær inneholder store mengder med de fenoliske forbindelsene antocyaniner, som er hevdet å ha sterke antioksiderende egenskaper [24, 65]. De antioksiderende egenskapene til bærene er hevdet å ha helsemessig gunstige effekter [15, 18, 66], og har ført til et betydelig økt salg og konsumerings av denne typen preparater [67]. De fire bærpreparatene som ble undersøkt for eventuell AA i denne oppgaven, ble primært plukket ut av den grunn.

Resultatene fra målingen av AA, viste at verken blåbær eller svarthyllbær hadde tydelig grad av hemming. Svartsurbær viste høy grad av hemming i de to høyeste konsentrasjonene fra fraksjonen hvor bærene var ekstrahert med 50 % etanol, og deretter opprenset på kolonne med metanol. Denne metoden blir hovedsakelig brukt for å isolere og karakterisere proantocyanidiner fra planteekstrakter. Det er beskrevet at etanol, vann og metanol er effektivt til dette formålet [68]. Denne informasjonen gir grunn til å tro at nevnte fraksjon fra svartsurbær, inneholdt blant annet proantocyanidiner da AA ble målt. Hemmingen som ble sett hos svartsurbær viste derimot ikke en tydelig konsentrasjonsavhengighet, og kurvetilpassingen var dårlig. Lavere korrelasjon taler i mot at det er en virkelig antikolinerg aktivitet som blir utøvd, noe som betyr at denne fraksjonen fra svartsurbær mest sannsynlig ikke hadde antikolinerge egenskaper.

Det er mulig at fraksjonen inneholdt proantocyanidiner og fenoliske forbindelser som procyaniner og antocyaniner, og at høye konsentrasjoner av disse forbindelsene interagerer med bindingen av ligand. Dette er store molekyler, med sammenhengende ringer av karbon [24], og forbindelsene kunne kanskje fortrenge noe av den spesifikt bundne liganden, eller forhindre liganden fysisk i å binde seg til reseptorene.

Tranebær som blir brukt i behandling av lette, ukompliserte urinveisinfeksjoner, UVI, inneholder også forbindelser som antocyaniner og proantocyanidiner [19], men ingen av ekstraktene eller fraksjonene med tranebær viste tegn til AA. Dette betyr at antocyaniner og proantocyanidiner kan trolig ikke kan utøve AA alene. Ekstraktene fra blåbær ga heller ikke

store utslag på målingene av AA. Siden studier har vist at tilskudd av blåbær til eldre med begynnende tegn til demens kan forbedre hukommelsen [69], var det helle ikke forventet at blåbær skulle gi utslag på målingen av AA. Resultatene viser til dels høyt SD hos de fire bærpreparatene, noe som kan skyldes litt dårlig løselighet i enkelte stamløsninger.

Generelt ser det ut til at antioksidantene i bærene, representert av flavanoider som antocyaniner og tanniner som proantocyanidiner, ikke utøvde AA i betydelig grad. I tilfellet hvor det ble målt AA hos svartsurbær, så kan det tenkes at årsaken var svært høye konsentrasjoner, og at liganden ble forhindret eller fortrenget fra bindingssetet på reseptorene, uten at forbindelsene i ekstraktet selv hadde noen aktivitet. Innholdsstoffene i VitaePro[®] er også antioksidanter, men er strukturelt sett svært forskjellig fra antioksidantene i bærpreparatene. Astaxanthin i VitaePro[®] tilhører terpenene, mens antioksidantene i bærpreparatene tilhører gruppene med flavanoider og tanniner [20, 68], og antioksidantene er derfor strukturmessig ulike.

Planter inneholder ofte store mengder alkaloider [20], og bortsett fra VitaePro[®] er det stor grunn til å anta at AA som ble sett hos bitterlupinbønnene, prikkperikum og legevendelrot, skyldes tilstedeværelsen av ulike alkaloider. Alkaloidene som er identifisert i de tre preparatene [20, 49, 50], har en strukturell likhet med ACh og atropin. De inneholder et tertiært amin som mest sannsynlig er viktig for bindingen til reseptorene. Det er kjent at atropin binder seg spesifikt til alle de fem muskarinerge reseptorene [1, 2, 10]. På grunn av kjemisk likhet med ACh og atropin, er det stor grunn til å tro at alkaloidene som er identifisert i preparatene, også kan ha evnen til å fungere som antagonister på muskarinerge reseptorer.

Prøveopparbeidelse

Alt prøvemateriale måtte opparbeides før AA kunne bli målt. Alle preparatene, foruten kosttilskuddet VitaePro[®] og rensubstansene lutein, zeaxanthin og astaxanthin, ble ekstrahert med ulike løsemidler før de kunne opparbeides videre slik at AA kunne undersøkes i prøver

med ekstrakt. Ekstrahering med både lipofile og hydrofile løsemidler gjorde at forbindelsene i preparatene ble separert etter kjemiske egenskaper. Videre prøveopparbeidelse ble på denne måten enklere ved at forbindelsene i ekstraktene med de ulike løsemidlene hadde forholdsvis lik løselighet. Dette var en måte å sikre at alt i ekstraktene ble godt løst opp ved tilberedningen av stamløsningene og i prøvene som skulle analyseres.

Materialet ble først ekstrahert med diklormetan. Alle disse ekstraktene ble seige og tykke løsninger, med en brungrønn farge og tydelige innhold av upolare forbindelser. Videre ble restmaterialet ekstrahert med 96 % etanol. De sterke fargene på disse ekstraktene bekreftet at mye av pigmentene i preparatene ble ekstrahert ut i dette løsemidlet. Det er kjent at antocyaniner, vannløselige pigmenter, er tilstede i høye konsentrasjoner i mørke bær [15, 31]. Dette kan trolig forklare den intense fargen hos bærekstraktene, men også prikkperikum, legevendelrot og dvergpalm fikk kraftige farger ved ekstrahering med etanol. Trolig inneholder prikkperikum, legevendelrot og dvergpalm også en del antocyaniner, men også andre forbindelser kan ha evnen til å gi ekstraktene kraftige farger [20]. I 50 % etanolekstraktene ble sannsynligvis resten av antocyaninene, og eventuelle andre fargestoffer, ekstrahert ut sammen med andre polare forbindelser. De sterke fargene på også disse ekstraktene, underbygger denne teorien.

Det var på forhånd usikkert om de valgte preparatene i denne oppgaven hadde antikolinerge egenskaper, og siden lignende studier ikke er blitt utført tidligere, var det ingen konkrete metoder å forholde seg til i forhold til gjennomføringen av prøveopparbeidelsen.

Konsentrasjonene på stamløsningene ble derfor valgt litt tilfeldig, og i forhold til hvilke konsentrasjoner som var mulige å lage i praksis. Det måtte tas hensyn til hvor mye stoff som faktisk lot seg løse i det aktuelle løsemidlet. Alle stamløsningene som ble brukt til videre prøveopparbeidelse, så ut til å være oppløst da de ble laget, men noen fikk litt bunnfall ved henstand. Miksing av løsningene før selve prøvene ble laget, sørget for at hver prøve fikk nøyaktige konsentrasjoner. Eventuelle løselighetsproblemer, er uansett en faktor som må tas i betraktning ved vurderingen av resultatene. For at denne faktoren skulle få så liten betydning som mulig, ble det for de aller fleste preparatene laget flere stamløsninger med ulike konsentrasjoner. For zeaxanthin og astaxanthin ble tilgjengelig stoffmengde litt

avgjørende for hvilke stamløsninger som ble laget, og videre hvilke konsentrasjoner som ble analysert.

Det var også nødvendig å bekrefte at de valgte løsemidlene var kompatible med de andre komponentene i inkubasjonsmiksturen. Analyser med hvert løsemiddel fortynnet i fosfatbuffer inkludert BSA, bekreftet at løsningene kunne kombineres. Det ble målt noe fortrenging av ligand i de blanke prøvene som inneholdt enten DMSO, MeOH eller rensset vann. Denne hemmingen forårsaket av løsemidlene ble det imidlertid korrigert for i presentasjonen av resultatene. Fortrengingen av ligand i hver enkelt prøve ble målt og presentert som hemmingsgrad i %, i forhold til kontrollprøve med samme løsemiddel.

Metoden for måling av AA

Metoden for å måle AA ble utviklet for å analysere AA i serum [10]. Siden metoden for å måle AA ikke er blitt benyttet i tilsvarende studier tidligere, var det nødvendig med litt tilpasning.

Serum er et biologisk materiale som blant annet har en høy konsentrasjon av proteiner [70]. I denne oppgaven ble det målt AA i ikke-biologisk materiale, og prøver med ekstrakt fra preparatene ble først fortynnet i ren fosfatbuffer. Tilsvarende matriks ble benyttet til å fortynne standardkurven med atropin. Dette ga imidlertid svært ujevne resultater og standardkurven var ikke tilfredsstillende. Løsningen ble å tilsette 3 % BSA til fosfatbufferen før den videre ble benyttet til å fortynne prøvene. Dette ga tilfredsstillende resultater og det kunne se ut til at tilstedeværelsen av proteiner var nødvendig for å oppnå stabile standardkurver. Tilsvarende funn, hvor prøver uten serum ble analysert og sammenlignet med prøver som innehold serum, ble gjort av Tune og Coyle da de utviklet denne metoden [10].

Metoden fungerte bra da BSA ble tilsatt i fosfatbufferen. Standardkurven med atropin viste god korrelasjon, med en R^2 -verdi lik $0,95 \pm 0,03$. Dette er noe lavere enn kravene i

bioanalytiske metoder, om at R^2 -verdien for standardkurver bør være lik 0,99 eller høyere [59]. Den gjennomsnittlige verdien som ble oppnådd i denne oppgaven, vurderes imidlertid som tilfredsstillende i dette tilfellet. Atropin ble først og fremst benyttet i en enkel konsentrasjon i området rundt IC_{50} -verdi, for å ha en positiv kontroll med i hver måling slik at validiteten til metoden ble opprettholdt. Resultatene i denne oppgaven presenteres ikke i ”atropin-ekvivalenter” som er vanlig ved bruk av denne metoden [10, 53]. Dette på grunn av ukjent innhold og dermed ukjente konsentrasjoner i de aller fleste tilfellene hvor AA ble målt i denne oppgaven. Tilsetting av BSA i fosfatbufferne viste en liten grad av hemming i forhold til fosfatbuffer uten BSA, men siden alle prøvene inneholdt samme mengde fosfatbuffer inkludert BSA, vurderes det som en ubetydelig faktor for resultatene i denne oppgaven.

Variasjonen som ble sett i resultatene i denne studien, kan først og fremst forklares med at det i metoden blir benyttet biologisk materiale. Reseptorpreparatet ble laget manuelt av rottehjerner, fortynnet i fosfatbuffer. Den manuelle tilberedningen er en faktor som kan gi variasjon i resultatene. Studier har vist at antall muskarinerge reseptorer kan variere naturlig mellom rotter [71], og derfor kan antall reseptorer i den endelige løsningen som ble brukt, ha variert og gitt ulikt antall reseptorer tilgjengelige.

6. Konklusjon

Målet med oppgaven var å kartlegge antikolinerg aktivitet, AA, i utvalgte naturpreparater og næringsmidler. I denne studien ble det målt AA i 13 ulike preparater. Disse preparatene ble hovedsakelig valgt ut med tanke på at de skulle være aktuelle for bruk hos eldre, siden eldre er de som er mest utsatt for påvirkning av AA.

VitaePro[®] var det preparatet som utøvde høyest grad av AA, og som hadde den beste kurvetilpasningen med svært høy korrelasjon. Av de tre deklarte innholdsstoffene i VitaePro[®], var det astaxanthin som viste størst hemmingsgrad og god kurvetilpasning. Det er tydelig at innholdsstoffene i VitaePro[®] har potensielle antikolinerge egenskaper, men det er ukjent hvorvidt stoffene har evnen til å passere BHB. Hvilke serumkonsentrasjoner som må til, er heller ikke kjent og det er derfor for tidlig å si om resultatet er av klinisk betydning.

Det ble også funnet høy grad av aktivitet i bitterlupinbønner, prikkperikum og legevendelrot. Siden det er kjent at inntak av bitterlupin har gitt antikolinerge symptomer, var det forventet at bitterlupinbønnene utviste AA. De rapporterte tilfellene om antikolinerge symptomer, bekrefter at de aktive forbindelsene i bitterlupinbønner, har evnen til å passere BHB og utøve effekt i CNS. Inntak av prikkperikum og legevendelrot er ikke dokumentert å ha gitt antikolinerge symptomer, men resultatene viser at de har potensielle antikolinerge egenskaper. Hvorvidt forbindelsene som utøvde den målte AA i disse preparatene kan passerer BHB, og hvilke serumkonsentrasjoner som er nødvendige for at det skal være klinisk relevant, er ennå ukjent.

Ingen av bærpreparatene viste høy grad av konsentrasjonsavhengig hemming. Med tanke på den utbredte bruken av disse preparatene, var det heller ikke forventet å finne høy grad av AA. Resultatene tyder på at ingen forbindelser i de fire bærpreparatene har antikolinerge egenskaper. Manglende innhold av alkaloider kan være en forklaring, siden det i ser ut til at tilstedeværelse av alkaloider har en sammenheng med målt AA i denne studien.

Det er ikke blitt utført tilsvarende studier på denne typen preparater tidligere og funnene i denne oppgaven kan være viktige for pasienter som er predisponerte for reduserte kognitive funksjoner. Et inntak av naturpreparater eller næringsmidler med potensiell AA, kan være det som skal til for at total påvirkning av AA blir for stor, slik at antikolinerge symptomer oppstår.

7. Veien videre

Som en fortsettelse av denne studien vil det være aktuelt å gå videre med de preparatene som tydelig utøvde antikolinerg aktivitet, AA. En identifisering av hvilke forbindelser som utøver aktiviteten som ble sett i noen av preparatene, vil kunne gi mer informasjon om hvilke kliniske betydninger funnene i denne studien har. Strukturoppklaringer vil gi mulighet for å si mer om sannsynligheten for at forbindelsene kan utøve AA *in vivo*.

For de preparatene hvor det ble sett tydelig tegn til aktivitet, men ikke ble målt AA i konsentrasjonskurver, vil dette være aktuelt for å kunne si mer om hvorvidt aktiviteten er konsentrasjonsavhengig.

For pasienter med en legemiddelbehandling hvor det inngår legemidler som utøver AA, vil det være viktig å fortsette undersøkelsen av naturpreparater og næringsmidler i forhold til om de innehar potensielle antikolinerge egenskaper. For denne gruppen kunne en oversikt over hvilke preparater som har potensiell AA, og som de bør være oppmerksomme på, ha vært til stor nytte. Videre vil det fortsatt være mest aktuelt å undersøke preparater som blir brukt av eldre, i tillegg til at det kunne vært interessant å undersøke vanlige næringsmidler som kaffe, te og vin.

Kildeliste

1. Siegel GJ, Albers, R.W., Brady, S.T., Price, D.L. (Ed.): *Basic Neurochemistry, Molecular, Cellular and Medicinal Aspects. Acetylcholine, chapter 11*. Seventh Edition edition. Cananda: Elsevier Academic Press; 2006.
2. Brunton LL, Lazo, J.S., Parker, K.L (Ed.): *Goodman & Gilman's The pharmacological basis of therapeutics*. 11th edition edition. New York: McGraw-Hill; 2006.
3. Rang HP, Dale, M.M., Ritter, J.M., Moore, P.K.: *Pharmacology*. Fifth edition edition: Churchill Livingstone; 2003.
4. Nathanson NM: **Molecular Properties of the Muscarinic Acetylcholine Receptor**. *Annu Rev Neurosci* 1987, **10**:195-236.
5. Hosey MM: **Diversity of structure, signaling and regulation within the family of muscarinic cholinergic receptors**. *FASEB J* 1992, **6**(3):845-852.
6. Caulfield MP: **Muscarinic Receptors: Characterization, coupling and function**. *Pharmacology & Therapeutics* 1993, **58**(3):319-379.
7. Chew ML, Mulsant, B.H., Pollock, B.G., Lehman, M.E., Greenspan, A., Mahmoud, R.A., Kirshner, M.A., Sorisio, D.A., Bies, R.R., Gharabawi, G.: **Anticholinergic Activity of 107 Medications Commonly Used by Older Adults**. *Journal of the American Geriatrics Society* 2008, **56**(7):1333-1341.
8. Shah GN, Mooradian, A.D.: **Age-related changes in the blood-brain barrier**. *Experimental Gerontology* 1997, **32**(4-5):501-519.
9. Han L, McCusker J, Cole M, Abrahamowicz M, Primeau F, Elie M: **Use of Medications With Anticholinergic Effect Predicts Clinical Severity of Delirium Symptoms in Older Medical Inpatients**. *Arch Intern Med* 2001, **161**(8):1099-1105.
10. Tune L, Coyle JT: **Serum levels of anticholinergic drugs in treatment of acute extrapyramidal side effects**. *Archives of General Psychiatry* 1980, **37**(3):293-297.
11. Tune LE, Egeli, S.: **Acetylcholine and Delirium**. *Dementia and Geriatric Cognitive Disorders* 1999, **10**(5):342-344.
12. Pingault NM, Gibbs, R.A., Barclay, A.M., Monaghan: **Two cases of anticholinergic syndrom associated with consumption of bitter lupin flour**. *MJA* 2009, **191**(3):173-174.
13. Litkey J, Dailey MW: **Anticholinergic toxicity associated with the ingestion of lupini beans**. *The American Journal of Emergency Medicine* 2007, **25**(2):215-217.
14. Kurzbaum A, Safori, G., Monir, M., Simsolo, C.: **Anticholinergic Syndrome in Response to Lupin Sees Toxicity**. *Israeli Journal of Emergency Medisine* 2008, **8**(2):20-21.
15. Szajdek A, Borowska E: **Bioactive Compounds and Health-Promoting Properties of Berry Fruits, A Review**. *Plant Foods for Human Nutrition* 2008, **63**(4):147-156.
16. Hudec J, Kochanova, R., Burdova, M., Kobida, L., Kogan, G., Turianica, I., Chlebo, P., Hanakova, E., Slamka, P.: **Regulation of the Phenolic Profile of Berries Can Increase Their Antioxidant Activity**. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2009, **57**(5):2022-2029.
17. Ochmian I, Oszmianski J, Skupien K: **Chemical composition, phenolics, and firmness of small black fruits**. *J Appl Bot Food Qual-Angew Bot* 2009, **83**(1):64-69.

18. Bjelakovic G, Nikolova, D., Gluud, L.L., Simonetti R.G., Gluud, C.: **Antioxidant supplements for prevention of mortality in healthy participants and patients with various diseases.** *Volume Issue 2. Art. No.: CD007176. DOI: 10.1002/14651858.CD007176.* 19.02.2008 edition.: Cochrane Database of Systematic Reviews 2008.
19. He X, Liu RH: **Cranberry Phytochemicals: Isolation, Structure Elucidation, and Their Antiproliferative and Antioxidant Activities.** *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2006, **54**(19):7069-7074.
20. Heinrich M, Barnes, J., Gibbons, S., Williamson, E.M. (Ed.): *Fundamentals of Pharmacognosy and Phytotherapy.* First edition. London: Churchill Livingstone, Elsevier; 2004.
21. Borchers AT, Keen CL, Stern JS, Gershwin ME: **Inflammation and Native American medicine: the role of botanicals.** *Am J Clin Nutr* 2000, **72**(2):339-347.
22. Kaack K, Austed, T.: **Interaction of vitamin C and flavonoids in elderberry (Sambucus nigra L.) during juice processing.** *Plant Foods for Human Nutrition* 1998, **52**(3):187-198.
23. **Svartsurbær, Aronia melanocarpa**
[http://www.rolv.no/urtemedisin/medisinplanter/aron_mel sett: 30.04.2010]
24. Kulling SE, Rawel HM: **Chokeberry (Aronia melanocarpa) - A Review on the Characteristic Components and Potential Health Effects.** *Planta Med* 2008, **74**(13):1625-1634.
25. **Blåbær Vaccinium myrtillus**
[http://www.rolv.no/urtemedisin/medisinplanter/vacc_myr.htm sett: 30.03.2010]
26. Matsunaga N, Chikaraishi Y, Shimazawa M, Yokota S, Hara H: **Vaccinium myrtillus (Bilberry) Extracts Reduce Angiogenesis In Vitro and In Vivo.** *Evidence-based Complementary and Alternative Medicine* 2010, **7**(1):47-56.
27. The European Scientific Cooperative on Phytotherapy E (Ed.): *ESCOP Monographs The Scientific Foundation for Herbal Medicinal Products, Myrtilli fructus.* Second Edition edition: Thieme; 2003.
28. Cimolai N, Cimolai T: **The cranberry and the urinary tract.** *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases* 2007, **26**(11):767-776.
29. Hjelmstad R: **Amerikanske tranebær, Vaccinium macrocarpon.** 03.01.2010 edition.: Urtekildens planteleksikon; 2010.
30. Di Martino P, Agniel, R., David, K., Templer, C., Gaillard, J., Denys, P., Botto, H.: **Reduction of Escherichia coli adherence to uroepithelial bladder cells after consumption of cranberry juice: a double-blind randomized placebo-controlled cross-over trial.** *World Journal of Urology* 2006, **24**(1):21-27.
31. Puupponen-Pimiä R, Nohynek L, Alakomi H-L, Oksman-Caldentey K-M: **Bioactive berry compounds—novel tools against human pathogens.** *Applied Microbiology and Biotechnology* 2005, **67**(1):8-18.
32. **VitaePro, Ingredienser** [<http://www.vitaelab.no/Kosttilskudd/VitaePro/Ingredienser> sett: 10.03.2010]
33. Bernstein PS, Delori FC, Richer S, van Kuijk FJM, Wenzel AJ: **The value of measurement of macular carotenoid pigment optical densities and distributions in age-related macular degeneration and other retinal disorders.** *Vision Research* 2010, **50**(7):716-728.

34. Santocono M, Zurria M, Berrettini M, Fedeli D, Falcioni G: **Lutein, zeaxanthin and astaxanthin protect against DNA damage in SK-N-SH human neuroblastoma cells induced by reactive nitrogen species.** *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* 2007, **88**(1):1-10.
35. Park JS, Chyun JH, Kim YK, Line LL, Chew BP: **Astaxanthin decreased oxidative stress and inflammation and enhanced immune response in humans.** *Nutr Metab* 2010, **7**:10.
36. **St. John's Wort (*Hypericum Perforatum* L.): A Review**
[<http://www.healthy.net/scr/Article.aspx?Id=915&xcntr=9> sett: 11.01.2010]
37. **Prikkperikum, *Hypericum Perforatum***
[http://www.rolv.no/urtemedisin/artikler/hype_per/art1.htm sett: 30.03.10]
38. Moretti ME, Maxson, A., Hanna, F., Koren, G.: **Evaluating the safety of St. John's Wort in human pregnancy.** *Reproductive Toxicology* 2009, **28**(1):96-99.
39. Chatterjee SS, Nørdner, M., Koch, E., Erdelmeier, C.: **Antidepressant Activity of *Hypericum Perforatum* and Hyperforin: the Neglected Possibility.** *Pharmacopsychiatry* 1998, **31**(S 1):7-15.
40. Kumar V: **Potential medicinal plants for CNS disorders: an overview.** *Phytotherapy Research* 2006, **20**(12):1023-1035.
41. **Legevendelrot *Valeriana officinalis***
[http://www.rolv.no/urtemedisin/medisinplanter/vale_off.htm sett: 30.03.2010]
42. Pallesen S, Bjorvatn, B., Nordhus, I.H., Skjerve, A.: ***Valeriana* som sovemiddel.** *Tidsskrift for Den norske legeforening* 2002, **30**:122:2857-2859.
43. Houghton PJ: **The Scientific Basis for the Reputed Activity of Valerian.** *Journal of Pharmacy and Pharmacology* 1999, **51**:505-512.
44. **Dvergpalme *Serenoa repens***
[http://www.rolv.no/urtemedisin/medisinplanter/sere_rep.htm sett: 06.04.2010]
45. Buck AC: **Is there a scientific basis for the therapeutic effects of serenoa repens in benign prostatic hyperplasia? Mechanisms of action. Part 1 of 2** 2004, **172**:1792-1799.
46. Habib FK: **Serenoa repens: The Scientific Basis for the Treatment of Benign Prostatic Hyperplasia.** *European Urology Supplements* 2009, **8**(13):887-893.
47. Lockett D: **Lupini bean a bitter contamination risk for sweet albus lupin.** In NSW, Department of Primary Industries; 2007.
48. Hieta N, Hasan T, Kinen-Kiljunen S, Lammintausta K: **Lupin allergy and lupin sensitization among patients with suspected food allergy.** *Annals of Allergy, Asthma and Immunology* 2009, **103**:233-237.
49. Pothier J, Cheav SL, Galand N, Dormeau C, Viel C: **A comparative study of the effects of sparteine, lupanine and lupin extract on the central nervous system of the mouse.** *J Pharm Pharmacol* 1998, **50**(8):949-954.
50. Boschin G, Annicchiarico, P., Resta, D., Da Agostina, A., Arnoldi, A.: **Quinolizidine Alkaloids in Seeds of Lupin Genotypes of Different Origins.** *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2008, **56**(10):3657-3663.
51. El-Adawy TA, Rahma EH, El-Bedaway AA, Gafar AF: **Nutritional potential and functional properties of sweet and bitter lupin seed protein isolates.** *Food Chemistry* 2001, **74**(4):455-462.

52. Cancelli I, Beltrame M, Gigli GL, Valente M, Cancelli I, Beltrame M, Gigli GL, Valente M: **Drugs with anticholinergic properties: cognitive and neuropsychiatric side-effects in elderly patients.** *Neurol Sci* 2009, **30**(2):87-92.
53. Jakobsen SM: **Bestemmelse av antikolinerg aktivitet i serum.** Bergen: Masteroppgave i farmasi ved Universitet i Bergen; 2009.
54. Lorentzen G: **Frysetøking.** In *Store Norske Leksikon*. 2010.
55. Jensen WB: **The Origin of the Soxhlet Extractor.** *Journal of Chemical Education* 2007, **84**(12):1913.
56. **Cooking Instructions** [<http://www.purcellmountainfarms.com/Lupini%20Beans.htm> sett: 19.03.10]
57. Bigott-Hennkens HM, Dannon, S., Lewis, M.R., Jurisson, S.S.: **In vitro receptor binding assays: general methods and consideration.** *The Quarterly Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging* 2008, **52**(3):245-253.
58. Dr.Motulsky H: **The GraphPad Guide to Analyzing Radioligand Binding Data I.** GraphPad Software, Editor GraphPad Prism 5; 1995-2001.
59. **Guidance for Industry, Bioanalytical Method Validation** [<http://www.fda.gov/downloads/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/UCM070107.pdf> sett: 24.04.2010]
60. Tune L, Coyle, J.T.: **Serum levels of anticholinergic drugs in treatment of acute extrapyramidal side effects.** *Archives of General Psychiatry* 1980, **37**(3):293-297.
61. Selvig AS: **Specification NaProLup P56-H125.** Horten: Selvig AS; 2009.
62. **PubChem Substance** [http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/summary/summary.cgi?sid=53086590&loc=es_rss sett: 04.2010]
63. Statens L: **Preparatomtale Valeriana Forte.** 06.10.1999 edition.: Felleskatalogen.no; 1999.
64. Statens L: **Preparatomtale Hypericum.** 23.11.1998 edition.: Felleskatalogen.no; 1998.
65. Veberic R, Jakopic J, Stampar F, Schmitzer V: **European elderberry (Sambucus nigra L.) rich in sugars, organic acids, anthocyanins and selected polyphenols.** *Food Chemistry* 2009, **114**(2):511-515.
66. Ciocoiu M, Mirón A, Mares L, Tutunaru D, Pohaci C, Groza M, Badescu M: **The effects ofSambucus nigra polyphenols on oxidative stress and metabolic disorders in experimental diabetes mellitus.** *Journal of Physiology and Biochemistry* 2009, **65**(3):297-304.
67. Naturmidler Bf: **Markedsdata.** Oslo: Bransjerådet for Naturmidler; 1978.
68. Serrano J, Puupponen-Pimiä R, Dauer A, Aura A-M, Saura-Calixto F: **Tannins: Current knowledge of food sources, intake, bioavailability and biological effects.** *Molecular Nutrition & Food Research* 2009, **53**(S2):S310-S329.
69. Krikorian R, Shidler MD, Nash TA, Kalt W, Vinqvist-Tymchuk MR, Shukitt-Hale B, Joseph JA: **Blueberry Supplementation Improves Memory in Older Adults.** *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2010, **58**(7):3996-4000.
70. Hauge JG, Aakvaag, Ruth K., Christensen, Terje B.: *Biokjemi*. 4. edition. Oslo: Universitetsforlaget; 2001.

71. Biegon A, Hanau M, Greenberger V, Segal M: **Aging and brain cholinergic muscarinic receptor subtypes: An autoradiographic study in the rat.** *Neurobiology of Aging* 1989, **10**(4):305-310.

Vedlegg I

Oversikt over ekstrakter/fraksjoner hvor antikolinerg aktivitet, AA, ble kartlagt

Svartsurbær (ARO)

CH ₂ Cl ₂ i DMSO	Diklormetaneekstrakt, løst i dimetylsulfoksid
CH ₂ Cl ₂ i MeOH	Diklormetaneekstrakt, løst i metanol
96 % E i MeOH	Etanolekstrakt 96 %, løst i metanol
96 % E i H ₂ O	Etanolekstrakt 96 %, løst i renset vann
50 % E i MeOH	Etanolekstrakt 50 %, løst i metanol
50 % E i H ₂ O	Etanolekstrakt 50 %, løst i renset vann
50 % E Lav i MeOH	Metanoluttrekk fra opprinnelig 50 % etanolekstrakt, opprenset på Amberlite XAD7, løst i metanol
50 % E Høy i H ₂ O	Etanolekstrakt 50 % opprenset på Amberlite XAD7 og videre gelfiltrert på Bio-Gel P-& DG, løst i renset vann
100 °C i H ₂ O	Vannekstrakt 100 °C, løst i renset vann
50 °C i H ₂ O	Vannekstrakt 50 °C, løst i renset vann

Svarthyllbær (SVART)

CH ₂ Cl ₂ i DMSO	Diklormetaneekstrakt, løst i dimetylsulfoksid
--	---

CH ₂ Cl ₂ i MeOH	Diklormetaneekstrakt, løst i metanol
96 % E i MeOH	Etanolekstrakt 96 %, løst i metanol
96 % E i H ₂ O	Etanolekstrakt 96 %, løst i renset vann
50 % E i MeOH	Etanolekstrakt 50 %, løst i metanol
50 % E i H ₂ O	Etanolekstrakt 50 %, løst i renset vann
50 % E Lav i MeOH	Metanoluttrekk fra opprinnelig 50 % etanolekstrakt, opprenset på Amberlite XAD7, løst i metanol
50 % E Høy i H ₂ O	Etanolekstrakt 50 % opprenset på Amberlite XAD7 og videre gelfiltrert på Bio-Gel P-& DG, løst i renset vann
100 °C i H ₂ O	Vannekstrakt 100 °C, løst i renset vann
50 °C i H ₂ O	Vannekstrakt 50 °C, løst i renset vann

Blåbær (BLÅ)

CH ₂ Cl ₂ i DMSO	Diklormetaneekstrakt, løst i dimetylsulfoksid
CH ₂ Cl ₂ i MeOH	Diklormetaneekstrakt, løst i metanol
96 % E i MeOH	Etanolekstrakt 96 %, løst i metanol
96 % E i H ₂ O	Etanolekstrakt 96 % løst i renset vann
50 % E i MeOH	Etanolekstrakt 50 %, løst i metanol
50 % E i H ₂ O	Etanolekstrakt 50 %, løst i renset vann
50 % E Lav i MeOH	Metanoluttrekk fra opprinnelig 50 % etanolekstrakt, opprenset på Amberlite XAD7, løst i metanol

50 % E Høy i H ₂ O	Etanolekstrakt 50 % opprenset på Amberlite XAD7 og videre gelfiltrert på Bio-Gel P-& DG, løst i renset vann
100 °C i H ₂ O	Vannekstrakt 100 °C, løst i renset vann
50 °C i H ₂ O	Vannekstrakt 50 °C, løst i renset vann

Tranebær (TRAN)

CH ₂ Cl ₂ i DMSO	Diklormetaneekstrakt, løst i dimetylsulfoksid
CH ₂ Cl ₂ i MeOH	Diklormetaneekstrakt, løst i metanol
96 % E i MeOH	Etanolekstrakt 96 %, løst i metanol
96 % E i H ₂ O	Etanolekstrakt 96 %, løst i renset vann
50 % E i MeOH	Etanolekstrakt 50 %, løst i metanol
50 % E i H ₂ O	Etanolekstrakt 50 %, løst i renset vann
50 % E Lav i MeOH	Metanoluttrekk fra opprinnelig 50 % etanolekstrakt, opprenset på Amberlite XAD7, løst i metanol
50 % E Høy i H ₂ O	Etanolekstrakt 50 % opprenset på Amberlite XAD7 og videre gelfiltrert på Bio-Gel P-& DG, løst i renset vann
100 °C i H ₂ O	Vannekstrakt 100 °C, løst i renset vann
50 °C i H ₂ O	Vannekstrakt 50 °C, løst i renset vann

Ekstrakter fra Prikkperikum (J.URT)

CH ₂ Cl ₂ i DMSO	Diklormetaneekstrakt, løst i dimetylsulfoksid
--	---

96 % E i MeOH

Etanolekstrakt 96 %, løst i metanol

50 % E i H₂O

Etanolekstrakt 50 %, løst i renset vann

Legevendelrot (VAL)

CH₂Cl₂ i DMSO

Diklormetaneekstrakt, løst i dimetylsulfoksid

96 % E i MeOH

Etanolekstrakt 96 %, løst i metanol

50 % E i H₂O

Etanolekstrakt 50 %, løst i renset vann

Dvergpalme (DVERG)

CH₂Cl₂ i DMSO

Diklormetaneekstrakt, løst i dimetylsulfoksid

96 % E i MeOH

Etanolekstrakt 96 %, løst i metanol

50 % E i H₂O

Etanolekstrakt 50 %, løst i renset vann

Søtlupin (LUP)

CH₂Cl₂ i DMSO

Diklormetaneekstrakt, løst i dimetylsulfoksid

96 % E i MeOH

Etanolekstrakt 96 %, løst i metanol

50 % E i H₂O

Etanolekstrakt 50 %, løst i renset vann

Bitterlupinbønner (LB)

CH₂Cl₂ i DMSO

Diklormetaneekstrakt, løst i dimetylsulfoksid

96 % E i MeOH	Etanolekstrakt 96 %, løst i metanol
50 % E i H ₂ O	Etanolekstrakt 50 %, løst i renset vann
Vann i H ₂ O	Vannekstrakt av bitterlupin etter tilbereding som anvist på pakken, løst i renset vann

Løsninger fra VitaePro[®], lutein, zeaxanthin og astaxanthin

VP i MeOH	Innhold i VitaePro [®] , løst i metanol
LUT i MeOH	Lutein rent stoff, løst i metanol
ZEA i MeOH	Zeaxanthin rent stoff, løst i metanol
ASTA i MeOH	Astaxanthin rent stoff, løst i metanol